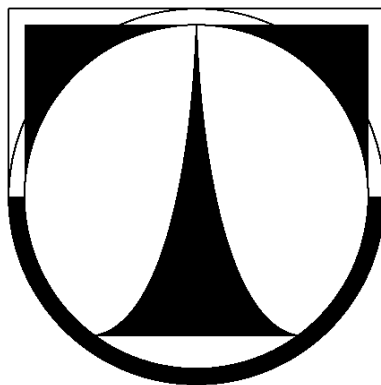


TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
FAKULTA TEXTILNÍ



DIPLOMOVÁ PRÁCE



LIBEREC 2009

KATARÍNA KORMANÍKOVÁ

TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI

FAKULTA TEXTILNÍ

Studijní program: Textilní inženýrství
Studijní obor: Netkané textilie
Katedra netkaných textilií

ZDRAVOTNÍ RIZIKA NANOVLÁKENNÝCH MATERIÁLŮ

HEALTH RISKS OF NANOFIBER MATERIALS

Autorka: Katarína Kormaníková
Vedoucí diplomové práce: Ing. Eva Košťáková

Počet stran textu: 80
Počet obrázků: 24
Počet tabulek: 11
Počet grafů: 7
Počet příloh: 3

Prehlásenie

Prehlasujem, že predložená diplomová práca je pôvodná a spracovala som ju samostatne. Prehlasujem, že citácia použitých prameňov je úplná, že som v práci neporušila autorské práva (v zmysle zákona č. 121/2000 Zb. O práve autorskom a o právach súvisiacich s právom autorským).

Súhlasím s umiestnením diplomovej práce v Univerzitnej knižnici TUL.

Bola som oboznámená s tým, že na moju diplomovú prácu sa plne vzťahuje zákon č. 121/2000 Zb. o práve autorskom, hlavne § 60 (školské dielo).

Beriem na vedomie, že TUL má právo na uzatvorenie licenčnej zmluvy o použití mojej diplomovej práce a prehlasujem, že **súhlasím** s prípadným použitím mojej diplomovej práce (predaj, požičanie apod.).

Som si vedomá toho, že použiť moju diplomovú prácu či poskytnúť licenciu k jej využitiu môžem len so súhlasom TUL, ktorá má právo odo mňa požadovať primeraný príspevok na úhradu nákladov, vynaložených univerzitou na vytvorenie diela (až do ich skutočnej výšky).

V Liberci, dňa 29. 5. 2009

.....
Podpis

Pod'akovanie

Predovšetkým by som chcela poďakovať Ing. Eve Košťákovéj za cenné rady a pripomienky, ktoré mi poskytovala po celú dobu tvorby diplomovej práce i za čas, ktorý mi venovala; ďakujem aj Ing. Jakubovi Hrůzovi, Ph.D., Doc. Ing. Lenke Martinovej, CSc., Filipovi Sanetrníkovi a Ing. Kateřině Vodsedálkovéj za poskytnuté nanovláknenné materiály a Mgr. Ireně Horskéj, Ph.D. za výrobu simulovanej pľúcnej tekutiny.

Taktiež ďakujem rodičom a všetkým, ktorí ma akýmkoľvek spôsobom podporovali počas celého štúdia.

Anotace

Tato diplomová práce se zabývá studiem zdravotních rizik nanovláknenných materiálů.

Teoretická část je věnovaná seznámení se s nanotechnologiemi, nanovláknennými materiály, jejich základnímu dělení, polymerům na jejich výrobu a technologii elektrostatického zvlákňování. Další část se zabývá místy možných vstupů nanovláknenných materiálů do lidského organismu, jejich účinkům na člověka a metodami testování nanovláknenných materiálů s ohledem na jejich možná rizika.

V experimentální části je experiment č. 1 zaměřený na hodnocení zdravotních rizik nanovláknenných materiálů při jejich interakci se simulovanou plicní tekutinou a experiment č. 2 na oddělování vláken z nanovláknenných vrstev.

Klíčová slova: nanovláknena, uhlíkové nanotuby, zdravotní rizika, simulovaná plicní tekutina, bioperzistence

Annotation

This diploma work is focused on health risks of nanofiber materials.

Theoretical section is devoted to get familiar with nanotechnologies, nanofiber materials, their elementary division, polymers used for the production and electrospinning technology. Next section is about possible places of inserting nanofiber materials into human body, their effects on people and testing methods of nanofiber materials regarding their possible risks.

In experimental section is experiment number 1 focused on evaluating health risks of nanofiber materials in interaction with simulated lung fluid and experiment number 2 focused on process of separating fibers from nanofiber layers.

Key words: nanofibers, carbon nanotubes, health risks, simulated lung fluid, biopersistence

Zoznam skratiek a značiek

BALF	bronchoalveolárny výplach
CNT _s	uhlíkové nanotuby
DDT	dichlórdifenyltrichlóretán
HEMA/EOEMA	kopolymér poly(2-hydroxyetylmetakrylátu) a 2-etoxyetylmetakrylátu
HBAL	ľudské primárne alveolárne makrofágy
ip	intraperitoneálny
MMVF _s	syntetické sklenené vlákno
MWNT _s	viacstenné nanotuby
nm	nanometer
NP	nanočastica
μm	mikrometer
PA	polyamid
PAN	polyakrylonitril
PCB	polychlórovaný bifenyl
PEOEMA	poly(2-etoxyetylmetakrylát)
PEOX	polyetylénoxid
PI	polyimid
PS	polystyrén
PUR 5	polyuretán 5
PUR 6	polyuretán 6
PVA	polyvinylalkohol
PVA/PAA	polyvinylalkohol sieťovaný kyselinou akrylovou
PVP	polyvinyliden pyrrolidon
RFP	vdýchnuteľné častice v tvare vlákna
SEM	skenovací elektrónový mikroskop
SLF	simulovaná pľúcna tekutina
SVF _s	syntetické sklenené vlákna
SWNT _s	jednostenné uhlíkové nanotuby
Al ₂ O ₃	oxid hlinitý
CaCl ₂	chlorid vápenatý
CaO	oxid vápenatý

$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$	kyselina 2-hydroxypropánová
CO_2	oxid uhličitý
HCl	kyselina chlorovodíková
$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CO}_2\text{H}$	glycín aminokyseliny
FeO	oxid železnatý
K_2O	oxid draselný
MgCl_2	chlorid horečnatý
MgO	oxid horečnatý
NaCl	chlorid sodný
$\text{NaC}_3\text{H}_3\text{O}_3$	pyruvát sodný
NaHCO_3	hydrogén uhličitán sodný
$\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$	tartrát sodný
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	citrát sodný
Na_2HPO_4	fosforečnan sodný
Na_2O	oxid sodný
Na_2SO_4	síran sodný
SiO_2	oxid kremičitý
TiO_2	oxid titaničitý
ZnO	oxid zinočnatý
ZrO_2	oxid zirkoničitý

Obsah

1 Úvod	9
2 Teoretická časť	10
2.1 Nanotechnológie a nanomateriály	10
2.1.1 Počiatky nanotechnológií	11
2.1.2 Uhlíkové nanotuby	12
2.1.3 Elektrostatické zvlákňovanie.....	15
2.2 Použitie nanovláknenných materiálov	18
2.3 Zdravotné riziká nanovláknenných materiálov	20
2.3.1 Miesta možných vstupov do ľudského organizmu	22
2.3.2 Nanovláknenné materiály v ľudskom organizme	23
2.3.3 Toxické splodiny z výroby nanočastíc	24
2.3.4 Nebezpečné vlastnosti nanovláken.....	25
2.4 Metódy testovania nanovláknenných materiálov s ohľadom na ich možné riziká.....	30
2.4.1 Testovanie elektrostaticky zvláknenných nanovláken	31
2.4.2 Testovanie nebezpečnosti uhlíkových nanotúb – in vivo	33
2.4.3 Testovanie nebezpečnosti sklenených vláken – in vivo.....	36
2.4.3.1 Chronická inhalačná štúdia stone wool u potkanov	37
2.4.3.2 Štúdia stone wool po intraperitoneálnej injekcii u potkanov	41
2.4.3.3 Posúdenie rizika pri expozícii sklenou vatou	44
2.4.3.4 Rýchlosť rozpúšťania sklo-keramických vláken v simulovanej pľúcnej tekutine	45
2.4.4 Testovanie nebezpečnosti p-aramidových vláken.....	45
3 Experimentálna časť	50
3.1 Použité materiály	51
3.2 Použité zariadenia	55
3.3 Experiment 1 - Testovanie nanovláknenných materiálov v simulovanej pľúcnej tekutine	57
3.4 Experiment 2 - Oddeľovanie vláken z nanovláknenných vrstiev.....	61
3.4.1 Oddeľovanie vláken z nanovláknenných vrstiev s použitím zariadenia Nu-Martindale 864	61
3.4.2 Oddeľovanie vláken z nanovláknenných vrstiev s použitím komorového žmolkovacieho prístroja.....	63
4 Diskusia	65
5 Záver	69
Zoznam použitej literatúry	71
Zoznam obrázkov	77
Zoznam tabuliek	79
Zoznam grafov	80
Zoznam príloh	80

1 Úvod

Nanotechnológie sa radia k jedným s najčastejšie diskutovaným technológiám súčasnosti. Využitie nanotechnológií a nanomateriálov je veľmi rozsiahle, uplatňujú sa v mnohých oblastiach bežného života, akými sú zdravotníctvo, stavebníctvo, elektronika, strojárstvo, optický, automobilový, kozmický priemysel a mnoho ďalších. Majú svoje nesporné výhody, ale je nutné zaoberať sa aj druhou stránkou veci a tou sú riziká, ktoré ich výroba, spracovanie a využívanie prináša.

Už pri samotnej výrobe nanočastíc vznikajú toxické látky, ktoré môžu mať vplyv na radu patologických procesov, akými sú ochorenia dýchacích ciest, zápaly, kardiovaskulárne ochorenia, fibrózy, alebo rakovina. Vlastnosti ako veľkosť, tvar, povrch, chemické zloženie, bioperzistencia a iné určujú, ako sú nanočastice vstrebávané do organizmu, ako sú metabolizované, ako toxicky pôsobia a ako sú vylučované. Bolo dokázané, že nanočastice sú biologicky aktívnejšie než väčšie častice a to v sebe skrýva potencionálne nebezpečenstvo, že pri stretnutí bunky a nanočastice môže vzniknúť stav, ktorý ovplyvní negatívne vývoj v tkanive.

Cieľom tejto diplomovej práce bolo aspoň základne upozorniť na možné zdravotné riziká práce s nanovláknennými materiálmi a nanočasticami obecné. V teoretickej časti sú uvedené základné pojmy a predstavené najpoužívannejšie nanovláknenné materiály, teda uhlíkové nanotuby a hlavne elektrostaticky zvláknené nanovlákná a tiež postupy ich výroby. Dôležitou časťou tejto diplomovej práce je potom rešerše, ktorá sa snaží upozorniť na riziká nanovláknenných a vybraných vláknenných materiálov, ktoré sú už dobre popísané a je možné z nich vychádzať pri štúdiu a odhadoch nebezpečnosti ďalších nanomateriálov. Experimentálna časť sa pokúša ukázať čo možno najjednoduchšiu cestu, ako testovať prienik elektrostaticky zvláknenných materiálov do ľudského organizmu (pľúc) a to cez dýchací systém. Experiment 1 sa teda zameriava na skúmanie chovania nanomateriálov pri ich interakcii so simulovanou pľúcnou tekutinou. Popisuje základný test, ktorý môže ukázať na ďalšiu rizikovosť nanovláken po vdýchnutí alebo toto riziko vylúčiť. Experiment 2 je zameraný na pokusy o testovanie oddelovania vlákien z nanovláknenných vrstiev ako na prvotný jav, ktorý môže ďalej umožňovať nanovláknam mobilitu a vstup do ľudského tela.

2 Teoretická časť

Táto kapitola pojednáva o nanotechnológiách a nanovláknenných materiáloch, ich delení, výrobe, použití. Rešerše, ktorá je súčasťou teoretickej časti, je zameraná priamo na literárne poznatky týkajúce sa zdravotných rizík nanomateriálov, respektíve nanovláken.

2.1 Nanotechnológia a nanomateriály

Najprv sú tu uvedené základné pojmy týkajúce sa problematiky riešenej v tejto diplomovej práci a najdôležitejšie z nich sú charakterizované podrobnejšie. Medzi základné pojmy patria nanotechnológia, nanomateriály, nanočastice, nanovlákná.

Nanotechnológia – navrhovanie, charakterizácia, výroba a použitie štruktúr, zariadení a systémov s určitými tvarmi a rozmermi v merítke nanometrov [1].

Nanomateriály – tento pojem sa používa pre popis materiálov s jedným alebo viacerými rozmermi v oblasti od 1 do 100 nanometrov a zahŕňajú nanočastice, nanovlákná, nanotuby, kompozitné nanomateriály a nanoštruktúrované povrchy [1].

Nanomateriály sa rozdeľujú do štyroch základných skupín:

- 0D – nanoelementy, nanočastice
- 1D – nanovlákná, nanotuby
- 2D – nanodoštičky
- 3D – kombinácia vyššie uvedených materiálov do väčších celkov

Nanočastice – sú podskupinou nanomateriálov, ktorá zahŕňa jednotlivé častice s priemerom menším než 100 nanometrov. Zhluky (aglomeráty) nanočastíc môžu byť väčšie než 100 nm v priemere [1]. Inak je tiež možné povedať, že nanočastice sú stavebnými prvkami nanotechnológie. Prostredníctvom cieleného zloženia materiálov na atómovej úrovni, ako aj zvláštnych fenoménov, ktoré sú viditeľné v takejto malej mierke, umožňujú veľký rozsah možností a to skoro vo všetkých oblastiach, ako je energetická technika, technika pre životné prostredie, zdravotníctvo, farmácia. Na atómovej úrovni sú malé rozdiely

medzi chémiou, biológiou a fyzikou a to všetko sa stáva prepojenou technológiou, takže sa medzi mnohými odvetviami stierajú hranice [41].

Nanovlákná – sú podskupinou nanočastíc (zahrňujúcou tiež nanotuby), ktorých dva charakteristické rozmery sú menšie než 100 nanometrov, ale tretí rozmer je mnohonásobne väčší [1].

Je ešte nutné poznamenať, že v tejto práci je s ohľadom na v praxi bežne užívanú terminológiu používané označenie „nanovlákná“ i pre materiály vlákenného typu s priemerom väčším než 100 nm. Teda, ako „nanovlákná“ budú označované vlákna až do priemeru 1000 nm.

2.1.1 Počiatky nanotechnológií

Jedným z prvých priekopníkov tejto vednej disciplíny bol americký vedec a nositeľ Nobelovej ceny za fyziku Richard Philips Feynman. Svoju prednášku *There's Plenty of Room at the Bottom* (Tam dole je plno miesta) predniesol v roku 1959 na výročnej schôdzi Americkej spoločnosti fyzikov v Caltechu. V prednáške zmienil možnosť manipulácie s molekulami a atómami. Vtedy nazýval tento obor mikrotechnológia. Na jeho počesť je každoročne udeľovaná Feynmanova cena za prínos v obore nanotechnológie.

Ďalší krok učinil v roku 1966 Simon, ktorý patentoval prístroj na výrobu ultratenkých a ultraľahkých nanovláknenných materiálov s použitím elektrostatického zvlákňovania. Zistil, že vlákna z nízko viskózných roztokov mali tendenciu sa skracovať a zjemňovať, zatiaľ čo vlákna z vysoko viskózných roztokov boli pomerne stále spojené.

V roku 1971 Baumgarten zhotovil prístroj k elektrosvláknovaniu akrylických vlákien s priemerom v rozmedzí 0,05 – 1,1 mikrometrov. Zvlákňovaná kvapka sa uvoľňovala z kapiláry z nerezovej ocele a jej stála veľkosť bola udržiavaná úpravou privádzanej rýchlosti infúznej pumpy. Kapilárna trúbka bola spojená s elektródou s vysokým napätím a vlákna boli zachytávané na uzemnenej kovovej clone.

V druhej polovici 20. storočia prebiehali výskumy zamerané na poznávanie vlastností základných stavebných prvkov hmoty a javov prejavujúcich sa na atómovej a molekulárnej úrovni. Hlavný záujem bol teda orientovaný na poznanie spôsobov, akými príroda vytvára rozmanité štruktúry. Jedným z najvýznamnejších objavov 80.-tych rokov sa stali prístroje

na pozorovanie a manipuláciu s atómami a molekulami - rastrovací tunelový mikroskop SPM a mikroskop atomárnych síl AFM [2].

Na týchto bádateľov a predovšetkým na ich nasledovníkov vo firmách Reneker a Chun a Larronda a Manley naviazal výskumnú činnosť tým profesora Oldřicha Jirsáka z Technickej univerzity v Liberci so zariadením Nanospider a priemyselnou výrobou nanovláken metódou elektrostatického zvlákňovania.

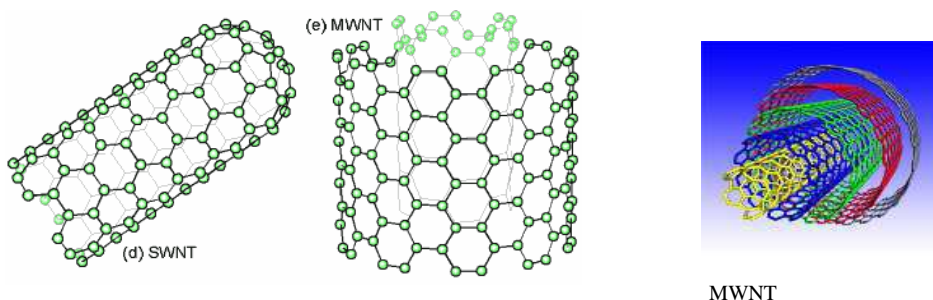
V súčasnej dobe prebieha po celom svete v rade výskumných inštitúcií a firiem intenzívny vývoj technológií výroby, spracovania a charakterizácie nanovláknenných materiálov. S ohľadom na jednoduchosť výroby, vlastne samoorganizáciu v elektrickom poli, je možné povedať, že najjednoduchšou výrobou nanovláknenných materiálov je práve elektrostatické zvlákňovanie, na ktoré je časť tejto diplomovej práce zameraná.

2.1.2 Uhlíkové nanotuby

Uhlíkové nanotuby - (Carbon Nanotubes, CNTs) sú jedným z najviac používaných nanomateriálov a zaraďujú sa do skupiny nanovláken. Sú to duté (trubicové) formy uhlíka, pripomínajúce plást včelieho vosku, ktoré sa dajú predstaviť ako grafitové fólie zrolované do valcovitého tvaru. Tieto nanotuby majú priemery v rozmedzí niekoľkých nanometrov a ich dĺžka sa pohybuje okolo niekoľkých mikrometrov. Každá nanotuba je samostatná molekula tvorená hexagonálnou mriežkou kovalentne spojených atómov uhlíka. Konce týchto nanotúb môžu byť zakončené napr. dvoma pologuľami fullerenu (tzv. uhlíkové balóny), do špičiek, alebo nemusia byť zakončené vôbec (tzv. otvorené nanotuby) [9].

Delenie uhlíkových nanotúb podľa štruktúry:

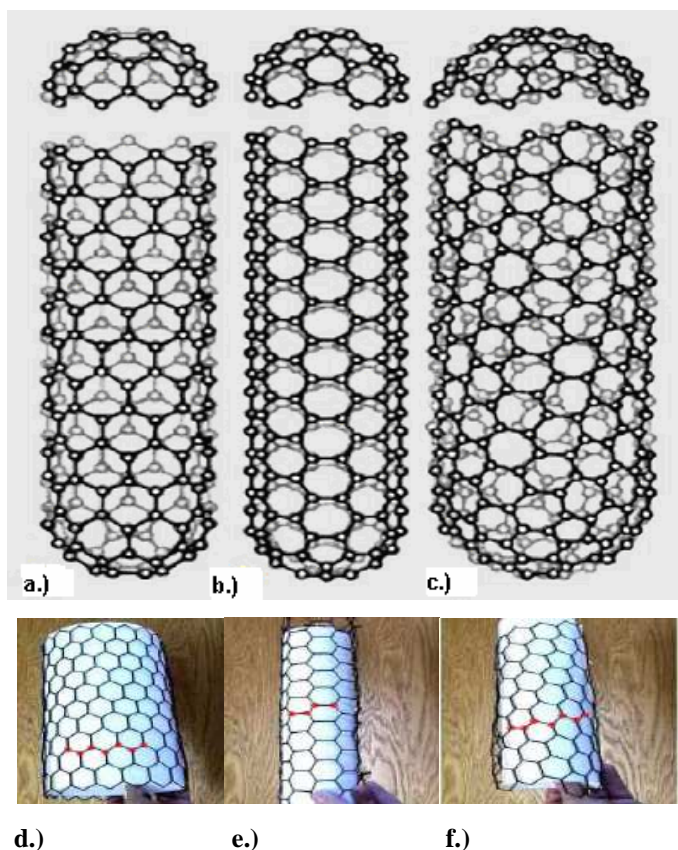
- *jednostenné nanotuby (Single - wall nanotubes) SWNTs*
- *viacstenné nanotuby (Multi - wall nanotubes) MWNTs*



Obr. 1: Štruktúry uhlíkových nanotúb [10].

Delenie uhlíkových nanotúb podľa usporiadania atómov:

- *armchair*
- *chiral*
- *zig-zag*



Obr. 2: a.), d.) Usporiadanie „armchair“, b.), e.) „chiral, c.), f.) zig-zag [8].

Vnútro trubičiek je možné vyplniť oxidmi kovov (Ni, Gd, Co, Fe, Yr, Cd, Sn), čistými kovmi (Ag, Au, Pd, Rh) alebo fullerenmi a získať tak vysoko vodivý drôtik s priemerom niekoľko nm.

Jednostenné uhlíkové nanotuby majú unikátne mechanické vlastnosti, ktoré sú omnoho lepšie než u najlepších ocelí (mechanická pevnosť 50 až 100-krát vyššia). To ich predurčuje ako materiál pre konštrukciu extrémne ľahkých a odolných kompozitov budúcnosti. Môžu sa chovať ako vodiče, aj ako polovodiče. Pritom sú veľmi dobre tepelne vodivé, chemicky odolné a v poslednej rade sa svojimi typickými rozmermi radia medzi „chladných vysielateľov“ elektrónov, či už pre účely generovania röntgenového zväzku, či pre ultraploché, vysoko svietivé displeje. Nanotuby sa využívajú ako diódy, tranzistory, ale tiež ako spevňovacie a vystužovacie zložky do plastov. Dajú sa z nich tiahnuť

ľahké a pritom veľmi tenké vlákna uhlíkovej priadze a transparentné fólie, ktoré majú schopnosť vysielat' teplo alebo svietit'. Dokážu sa samoorganizovať do zložitejších štruktúr. Takisto sú schopné sebaopravovania - ak chýba v štruktúre nanotuby atóm, dôjde k posunu ostatných atómov a medzera v nanotube sa zaplní [10, 11].

V dnešnej dobe existuje viacero spôsobov, ktorými sa dajú CNT_s vyrobiť [9]. Každá z technológií výroby musí spĺňať požiadavky kladené na ich štruktúru a čistotu. Nasledujúce technológiie majú dva spoločné body:

- zdroj uhlíka je v pevnej alebo plynnej forme
- vysoká teplota ($1\,000 \leq T \leq 6\,000\text{ K}$)

Laserová ablácia

Gulička grafitu je vložená do inertného prostredia kremíkovej tuby, tá je uzavretá v tepelnej komore s teplotou 1 200 °C. Energia laserového paprsku orientovaného na guľičku spôsobí vyparovanie grafitu, teda jeho chemický rozklad. Rôzne formy uhlíka z vyparujúceho sa grafitu sú zachytávané v rôznych oblastiach kremíkovej tuby, napr. na jej stenách, alebo v kónickom vodnom chladiči. Výsledkom tejto technológie sú prevažne MWNTs. Ich kvalita závisí na teplote v tepelnej komore, najvyššia kvalita sa dosiahne pri teplote 1 200 °C. Čím je teplota nižšia, tým je nižšia aj kvalita štruktúry MWNTs. Ak sa použije ako katalyzátor Ni alebo Co, tak výsledným produktom budú namiesto MWNTs SWNTs s vysokou kvalitou a čistotou.

Solárna energia

Princíp tejto technológie je založený na sublimácii zmesi práškoveho grafitu a katalyzátoru. Solárne paprsky dopadajú na ploché zrkadlo, z ktorého sa odrážajú na vypuklé zrkadlo a z neho sú potom smerované priamo na grafitové granule. Teplota okolo 4 000 K spôsobuje vyparovanie uhlíka a katalyzátoru, ktorých pary kondenzujú na studených stenách tepelnej clony. Ak sa použije nízky tlak a Ni/Co ako katalyzátor, sú výsledkom prevažne MWNTs. Pri vyššom tlaku sa získajú SWNTs.

Elektrický oblúk

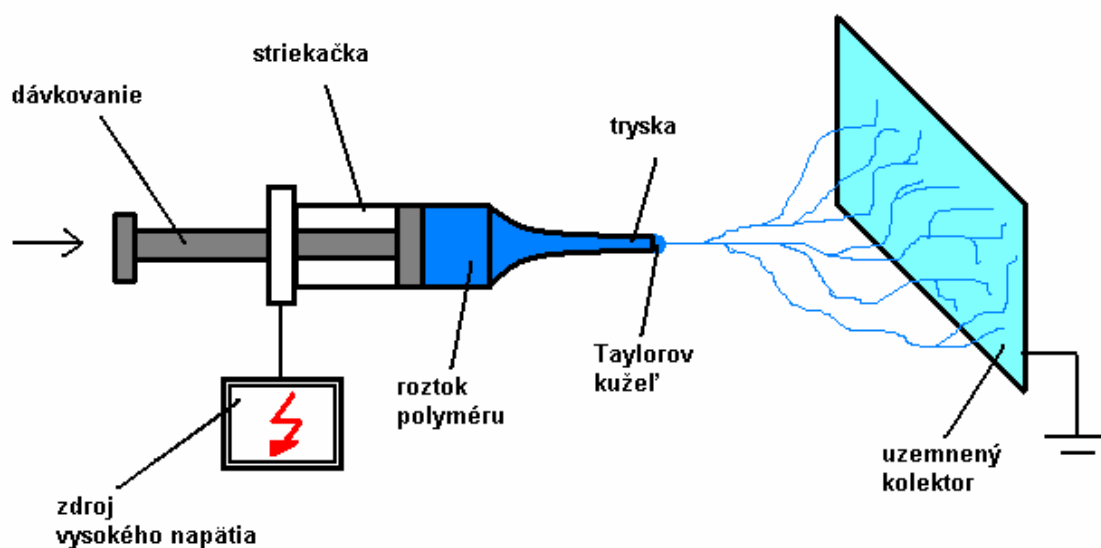
Pri tejto technológii dochádza k vyparovaniu uhlíka za prítomnosti katalyzátoru (Fe, Ni, Co, B) v redukčnej atmosfére inertného plynu (Ar, He). Po spustení elektrického oblúku medzi dvoma elektródami vzniká plazma zložená zo zmesi uhlíkových pár, vzácneho plynu a pár katalyzátoru. Vyparovanie je dôsledkom prenosu energie z elektrického oblúka na anódu vytvorenú grafitom. Touto metódou je možné získať SWNTs a MWNTs, ktoré vznikajú na rôznych miestach reaktoru.

Katalytické štiepenie plynného uhl'ovodíka

Tu sa využíva metóda rastu nanotúb z pár uhl'ovodíkov na katalyzátore (catalytic chemical vapor deposition). Táto metóda spočíva v chemickom rozklade uhl'ovodíkov pri vysokej teplote a v ich usadzovaní či formovaní sa do uhlíkových nanotúb na katalytickej podložke obsahujúcej častice kovov [9].

2.1.3 Elektrostatické zvlákňovanie

Elektrostatické zvlákňovanie umožňuje výrobu textilných vlákien s priermi v rade stoviek nanometrov. Tieto vlákna sú používané v netkaných textilných vrstvách a sú vhodné v aplikáciách, ako je tkanivové inžinierstvo, riadené dávkovanie liečiv, tepelné a hlukové filtre a ďalšie. Jav, behom ktorého dochádza ku vzniku takýchto jemných vlákien, je založený na aplikácii vysokého napätia v okolí polymérneho roztoku [15].



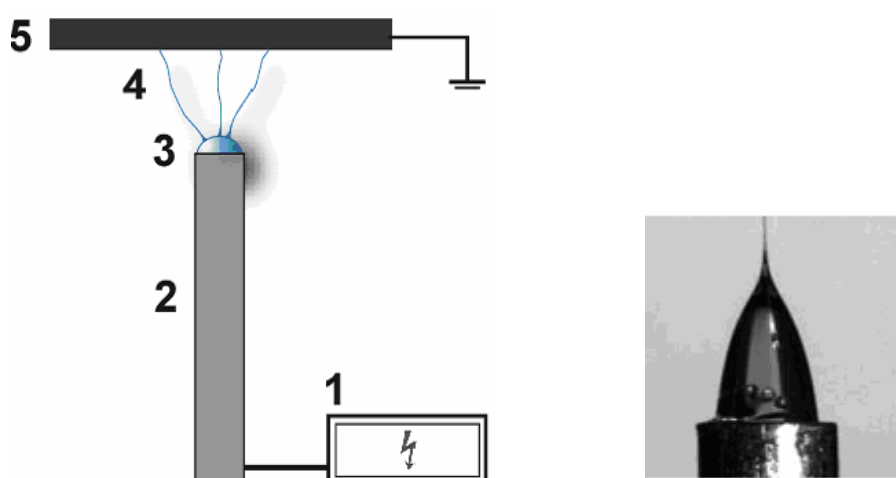
Obr. 3: Schéma elektrostatického zvlákňovania zo striekačky [3].

Najznámejší postup výroby nanovláken elektrostatickým zvlákňovaním je uvedený na obr. 3. Elektroda vysokého napätia je spojená priamo s polymérnym roztokom. Roztok je následne zvláknený kapilárou (zvlákňovacou tryskou). Vďaka vysokému elektrickému napätiu medzi špičkou kapiláry a uzemneným kolektorom vzniká tzv. Taylorov kužeľ na špičke kapiláry, z ktorého sú produkované vlákna. Vlákna stuhnú po odparení rozpúšťadla a vytvoria vlákennú vrstvu na povrchu uzemneného kolektora. Možností usporiadania

s ohľadom na elektrické pole je viac a záleží vždy na jednotlivých zvlákňovacích polymérnych roztokoch či taveninách.

Pokusné zariadenia popísané vyššie môžu za hodinu zhotoviť 0,1 - 1 gram vlákien [3]. Z toho vyplýva, že efektivita výroby je veľmi nízka a nie je vhodná pre priemyselnú výrobu, ale len pre laboratórne experimenty.

Existujú i ďalšie usporiadania elektrostatického zvlákňovania, tzv. bezihlové, ktoré sú doménou Katedry netkaných textílií. Zariadenie používané pre úvodné experimenty je uvedené na obr. 4.



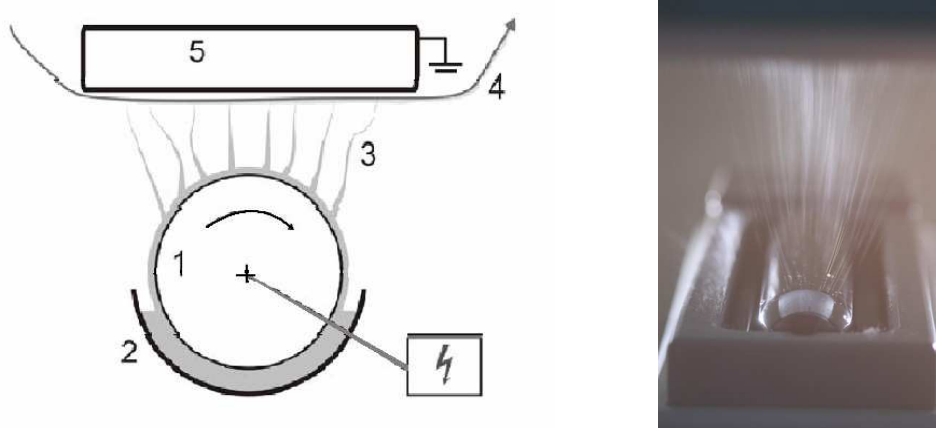
Obr. 4: Schéma elektrostatického zvlákňovania z voľného povrchu, z tyčky: 1-zdroj vysokého napätia, 2-kovová tyčka, 3-kvapka polymérneho roztoku alebo taveniny, 4-vznikajúce nanovlákná, 5-uzemnený kolektor zachytávajúci nanovlákná (vľavo) [8]; koniec kovovej kapiláry s polymérnym roztokom vytvarovaným do tvaru Taylorovho kužeľa (vpravo) [3].

Zariadenie Nanospider vyvinuté na Technickej Univerzite v Liberci pracuje s výkonom 1 - 5 g/min na 1 meter pracovnej šírky. Jeho princíp je ukázaný na obr. 5. Priemer vlákien je približne v rozmedzí 200 – 500 nm. Ide o modifikovaný spôsob prípravy nanovlákien a nanovláknenných vrstiev metódou elektrostatického zvlákňovania z roztokov polymérov. Na rozdiel od ostatných metód nepoužíva technológia Nanospider žiadne trysky ani kapiláry pre tvorbu vlákien, ale slúži k tomu rotujúci valec čiastočne ponorený do roztoku polyméru. Hlavnou výhodou tejto technológie je výrazný nárast výrobnnej kapacity, ktorú táto metóda ponúka. Spoločnosť Elmarco, ktorá s Technickou Univerzitou v Liberci úzko spolupracuje a vlastní licenciu na výrobu zariadenia založenom na danom princípe, sa podarilo vyrobiť nielen radu laboratórnych zariadení určených pre výskum a vývoj elektrostatického zvlákňovania, ale predovšetkým pilotné linky pracujúce v šírke viac než 1m

(obr. 6). V posledných rokoch súčasne firma Elmarco vyvinula ďalšie varianty technológie Nanospider, ktoré s úspechom umožňujú priemyselnú výrobu nanovláken na báze nevodorozpuštných polymérov, so súčasnou možnosťou nanášať nanovlákná i na materiály so značne nevýhodnými elektrickými vlastnosťami pre proces elektrostatického zvlákňovania. Všetky tieto nové metódy sú priebežne zapatentované.

Zásadné prednosti Nanospideru sú:

- Zvláknenie zaisťuje rotujúci cylinder, takže nie sú potrebné ihly, ktoré sa ľahko zanášajú.
- Vysoká kvalita nanovláknenného materiálu.
- Ľahká obsluha i čistenie.
- Vysoká produkčná kapacita [3].



Obr. 5: Princíp technológie Nanospider: 1-rotujúci valec, 2-nádržka s polymérnym roztokom, 3-vznikajúce nanovlákná, 4-nanovláknenná vrstva nesúca nanovlákná, 5-uzemnený kolektor [5, 7].



Obr. 6: Zariadenie Nanospider - priemyselná linka na výrobu nanovláken [6].

Vedľa elektrostatického zvlákňovania existuje niekoľko iných výrobných technológií pre výrobu nanovláken:

- Dĺženie
- Syntéza podložkou
- Fázová separácia
- Samozostavovanie
- Technológia Melt-blown
- Výroba bikomponentných vlákien

Všetky tieto metódy sú ale veľmi málo produktívne a majú viac kvalitatívnych nedostatkov než elektrostatické zvlákňovanie.

2.2 Použitie nanovláknenných materiálov

Je mnoho materiálov, ktoré sú z nanovláken vyrobené alebo ich obsahujú. Medzi často používané organické polyméry patria PVA, PA, PAN, PEOX, PS, PUR, PVP, Chitosan, želatína atď., z anorganických sú to napr. SiO_2 , Al_2O_3 , ZnO , TiO_2 , ZrO_2 [27].

V tejto kapitole je uvedených niekoľko odvetví, v ktorých sa nanovláknenné materiály najčastejšie využívajú. Patrí sem zdravotníctvo, potravinárstvo, elektronika, strojárstvo, stavebníctvo, kozmický priemysel a ďalšie [13]. V nasledujúcom prehľade sú bodovo vypísané najviac popisované aplikácie vo vyššie uvedených odvetviach:

Zdravotníctvo

- likvidácia tumorov – po ožiarení nanočastíc cielene usadených v nádorových tkanivách infračerveným, laserovým alebo vysokofrekvenčným elektromagnetickým žiarením dochádza k deštrukcii nádorového tkaniva;
- nanočastice oxidov ako kontrastných látok pre nukleárnu magnetickú rezonanciu;
- lab-on-chip (diagnostické laboratórium na čipe) - elektronická diagnostika, kde bude analyzátor skladajúci sa z miliónov nanočidiel schopný okamžite zobrazit' chemické zloženie tel'ných tekutín;
- cielená doprava liečiv - nanočastice sú schopné niesť liek a stať sa jeho dopravcami do tela, pritom ho chránia pred zničením a dopravlia ho presne na miesto určenia;
- transplantácie, implantáty (umelé kĺby, chlopne, náhrada tkanív);

- špeciálne antibakteriálne gély na rany - ničia baktérie, plesne, kvasinky a spóry, zvlhčujú ranu a zabráňujú obnaženiu nervových vlákien;
- opaľovacie ochranné krémy s nanočasticami oxidu zinočnatého (odrážajú UV žiarenie).

Potravinárstvo

- inteligentné a multifunkčné obaly pre zvýšenie trvanlivosti a kvality potravín;
- zisťovanie a neutralizácia mikroorganizmov alebo pesticídov;
- sledovanie pôvodu potravín pomocou miniaturizovaného „značkovania“;

Elektronika

- vysokokapacitné záznamové médiá (nosiče dát s veľmi vysokou hustotou záznamu);
- logické obvody na molekulárnej úrovni;
- zobrazovacie zariadenia s vysokým rozlíšením;
- fotomateriály a fotočlánky s dlhou životnosťou;
- palivové články (vhodné napr. i pre efektívne skladovanie vodíka);
- vysokokapacitné batérie;
- čidlá a detektory.

Strojárstvo

- nové, super pevné materiály;
- super tvrdé povrchy s nízkym trením, odolnejšie proti poškrabaniu a proti vode;
- samočistiace laky odolné voči odieraniu;
- kompozitné materiály.

Stavebníctvo

- izolačné materiály novej generácie;
- samočistiace fasádne nátery;
- antiadhézne obklady.

Kozmický priemysel

- katalyzátory a nové, vysoko účinné palivá, odolné povrchy satelitov.

Zvláštnu zmienku si zaslúžia kompozitné nanomateriály. Sú to materiály zložené z dvoch alebo viacerých rôznych zložiek, z nich sa aspoň jedna vyskytuje v materiáli vo forme častíc alebo vlákien, s rozmermi v nanometroch.

Väčšinou ide o nanočastice alebo nanovlákná aktívnej látky (tj. látky so zaujímavými magnetickými, elektrickými a inými vlastnosťami) rovnomerne rozptýlenej v inertnej matrici (napr. SiO₂, TiO₂, organické polyméry a iné), ktorej úlohou je niesť a pevne spájať jednotlivé nanočastice alebo nanovlákná a zároveň brániť ich priamemu kontaktu medzi sebou [14].

Kompozitné nanovlákná, ktoré vznikajú spojením CNT_s a elektrostaticky zvláknovaných nanovláken sa väčšinou vmiešajú do polymérneho roztoku určeného pre elektrostatické zvlákňovanie. Výsledkom sú kompozitné nanovlákná so špeciálnymi vlastnosťami. Ako polymérny roztok sa používa napr. PAN, PAN a TiO₂, syntetický hodváb, PC, PI, polykaprolakton a zlato alebo ZnO, PVA a SiO₂ a mnoho ďalších [5]. Vlastnosti nanokompozitov sa odvíjajú od zloženia, ale zároveň aj od veľkosti častíc alebo vlákien, ich morfológie a usporiadania. Kompozitné nanomateriály majú veľmi široké použitie, napr. ukladanie informácií, magnetické chladenie, ferrofluidy¹, zobrazovacie metódy v zdravotníctve, rôzne senzory, elektromechanické a magnetomechanické meniče, antiseptické vlákna a mnohé ďalšie [14].

2.3 Zdravotné riziká nanovláknenných materiálov

Nanovlákná patria do kategórie nanovláknenných materiálov, kam sa radia aj nanočastice. Úvod tejto kapitoly je preto venovaný rizikám nanočastíc obecné.

Nedá sa prehliadnuť skutočnosť, že sa už pár rokov množia hlásenia odborníkov na toxikológiu, že nanomateriály sú alebo môžu byť nebezpečné pre živé organizmy. Niektorí, hlavne ekologicky orientovaní odborníci, bijú na poplach veľmi intenzívne a navrhujú, aby bol rozvoj nanotechnológií prísne riadený a obmedzený.

Podľa fyzika Nielsa Boeinga je potrebné si nanotechniku a nanomateriály rozčleniť do troch kategórií, ktoré sa čo do svojej rizikovosti odlišujú. Ide o kategórie: izolovaná, bioaktívna a disruptívna (tj. rozvratná, deštruktívna) [37].

¹ **ferrofluidy** - tekuté suspenzie z mikroskopických magnetických častíc menších než 10 nm [14]

Izolované nanočastice

Väčšina súčasných techník a technológií pracuje so štruktúrami, do ktorých sú nanokomponenty vložené, resp. sú ich súčasťami a vďaka tomu sú izolované od okolitého prostredia. Do tejto kategórie patria napr. rôzne prístroje slúžiace ku skúmaniu povrchov a molekúl, materiály, ako sú samočistiace alebo antipriľnavé vrstvy. Štruktúru takého materiálu je najprv nutné za vynaloženia vysokej energie rozmelniť, aby z nej bolo možné získať nanočastice. Medzi izolované nanomateriály je nutné počítať i nanoelektroniku, čo súvisí so snahou umiestniť do čo najmenšieho priestoru čo najviac elektronických súčiastok.

Izolované nanomateriály sa teda javia ako ľudskému zdraviu či vôbec živým organizmom (relatívne) neškodné. Boeing však aj napriek tomu kladie otázku: čo sa stane s nanokomponentmi, keď prístroje a materiály, v ktorých sú obsiahnuté, doslúžia a musia byť vyradené? Čo s elektronickým či nanotechnickým "šrotom"? Koncepcia jeho recyklácie a znova používania zatiaľ nie je dostatočne ujasnená. Pokiaľ by sa podarilo dosiahnuť to, aby boli nanoaplikácie na konci svojej životnosti rozložené (fyzikálne a chemicky), dostali by sa do ďalšej kategórie, tj. stali by sa bioaktívnymi nanomateriálmi.

Bioaktívna nanotechnika

Už v roku 1994 jeden z najrenomovanejších psychológov Günter Oberdörster z univerzity v Rochesteru v štáte New York formuloval tézu, že ultrajemné čiastočky s priemerom menším než 100 nm môžu spôsobovať ujmy na zdraví. Jeho ďalšie zistenia boli dosť alarmujúce. Prišiel na to, že umelo vytvorené nanočastice, ktoré nie sú uložené v matrici (ako je tomu napr. u plastov), sú bioaktívne. To je vlastnosť, ktorá na jednej strane umožňuje, aby nanočastice boli používané v priemysle a v medicíne, ale na druhej strane táto vlastnosť v sebe skrýva to nebezpečenstvo, že pri stretnutí bunky a nanočastice môže vzniknúť interakcia, ktorá negatívne ovplyvní vývoj v tkanive.

Nebezpečné sú napr. nanočastice (uhlíkové molekuly) zvané buckminsterfullereny. Tento názov je odvodený od mena architekta Buckminstera Fullera, ktorého kopulovité stavby pripomínajú stavbu atómu v molekule tohoto nanomateriálu. Znáμου variantou takýchto molekúl sú Buckyballs, ktoré sa skladajú zo 60.-tich atómov vytvárajúcich guľu s priemerom 0,7 nm (C₆₀). Atómy sú usporiadané do päť a šesťhranných obrazcov, takže pripomínajú futbalovú loptu, ktorá je zošitá z podobne tvarovaných kúskov kože. Tieto nanočastice by sa raz mohli používať v medicíne a v solárnych bunkách. Ďalšou variantou bioaktívnych nanomateriálov sú napr. uhlíkové nanotuby.

Disruptívna nanotechnika

Je potrebné poznamenať, že termín disruptívna je nutné chápať primárne nie v negatívnom zmysle, pretože napr. pri terapiách sú niekedy potrebné razantné kroky a úkony. Do tejto skupiny nanočastíc patria mikroorganizmy vyvíjané vo sfére syntetickej biológie. Ide o vednú oblasť úzko spojenú s výskumom genetiky, pričom jedným z dôvodov je už to, že i v tejto disciplíne sa uvažuje a pracuje v dimenziách veľmi malých častíc [37].

Z vyššie uvedených poznatkov by sa dalo vyvodiť, že nanovlákná patria do skupiny bioaktívnej nanotechniky. Už pri ich výrobe a potom aj pri použití sa z nich môžu oddeľovať nanočastice a tým vzniká potencionálne riziko ich vstupu do ľudského tela.

2.3.1 Miesta možných vstupov do ľudského organizmu

Predpoklad, že cieľovou oblasťou jemných častíc je dýchací systém, už bol potvrdený v niekoľkých štúdiách [38, 42]. Existuje niekoľko teórií [39], ktoré vysvetľujú, prečo sú ultrajemné častice nebezpečnejšie ako častice väčšie. Jednou z nich je vysvetlenie, že jemné častice, ktoré prenikli do pľúcneho tkaniva, sú spozorované a pohltené makrofágmi². Naproti tomu častice menšie ako 100 nm nie sú rozpoznané a tak môžu preniknúť do výstelky bunky a nakoniec do krvného obehu. Toxicita častíc súvisí s ich veľkým merným povrchom. Čím menšie sú častice, tým väčšia je oblasť plochy, ktorú majú na jednotku hmotnosti a tým sa zvyšuje riziko poškodenia pľúc.

Tým amerických vedcov vedených Nancy Monteiro-Riviereovou z Nort Carolina State University publikoval štúdiu [39], ktorá odhalila prenikanie tzv. nanobodiek do poranenej pokožky. Napríklad kremíkové nanobodky sú maličké zhluky atómov, ktoré vykazujú veľmi zaujímavé vlastnosti, napríklad silnú luminescenciu. Ak sa na ne zasvieti slabým ultrafialovým laserom, svietia naspäť svetlo, ktoré možno vidieť. Prakticky sa táto vlastnosť využíva v medicíne, kde sa nanobodky používajú ako markery³. Vedia sa naviazať na molekulu nejakého lieku a keď sa dostanú do tela človeka, stačí zasvietiť laserom a mikroskopom vidno, kde presne sú tieto molekuly viazané v tkanivách. Monteiro-Riviereová

² **makrofág** - bunka schopná pohltiť a usmrtiť mikróby a cudzorodé častice, podieľa sa na obranyschopnosti organizmu [18]

³ **markery** - laboratórne preukázateľné známky, ktorými sa niektoré nádorové ochorenia skutočne prejavujú, vznikajú vďaka zmenám v metabolizme buniek, sú dôležitým pomocníkom v diagnostike a terapii nádorových ochorení [16]

spolu s Leshuaiem Zhangem zistili, že kvantové bodky síce neprenikajú do zdravej kože, ale v miestach škrabancov a odrenín prenikajú dostatočne hlboko, aby mohli vstúpiť do ciev a krvou potom putovali ďalej do tela.

Autori článku [38] uvádzajú ďalšie časti ľudského tela, do ktorých môžu nanočastice preniknúť:

- Pľúca – in vivo štúdie ukázali, že nanočastice môžu spôsobovať zápaly v pľúcach laboratórnych potkanov.
- Tráviaci trakt – nanočastice sú absorbované bunkami a tak získavajú prístup ku krvnému obehu a ten ich rozvádza do celého organizmu.
- Pokožka – nanočastice sa môžu dostať hlboko do pokožky a odtiaľ do lymfatického systému.

Z vyššie uvedených [38, 39] i ďalších prác [1] vyplýva, že najčastejším a najviac pravdepodobným miestom vstupu nanočastíc do ľudského tela je dýchací systém cez nos, ústa, až do pľúc. V nose a ústach je rada mechanizmov zabráňujúcich vniknutiu cudzím telesám, ale na nanočastice to väčšinou nestačí. Po ich prieniku je poslednou možnosťou, že budú zničené pľúcnou tekutinou, ktorá je v pľúcach prítomná. Pokiaľ tomu tak nie je a nanočastice sú voči pľúcnej tekutine odolné, môžu prejsť až do pľúcnych mechúrikov (alveol) a zabráňovať ich správnej funkcii podobne ako usadeniny z fajčenia cigariet.

2.3.2 Nanovláknenné materiály v ľudskom organizme

Ľudský organizmus takmer vždy reaguje na cudzorodú látku vo vnútri tela [37]. Tu sú popísané tri možnosti, ktoré sa môžu stať pri interakcii nanočastice so živou bunkou:

- na povrchu nanočastice stretávajúcej sa s vonkajším obalom bunky dochádza k oxidačnému stresu⁴, následkom toho sa zvýši hladina vápnika v bunke a v jej jadre môže dôjsť k nežiadúcej premene génov na proteíny a tie môžu vyvolať zápalový, resp. chorobný proces v tkanive;

⁴ **oxidačný stres** - porušenie rovnováhy medzi vznikom a odstraňovaním reaktívnych foriem kyslíka a dusíka, teda voľných radikálov obsahujúcich voľné elektróny, telo je nimi zaplavené a môže dôjsť k jeho poškodeniu [17]

- dôjde k aktivácii receptorových molekúl na bunčnom obale, pretože atómy kovov sa vylúčia z nanočastíc, ďalší priebeh je už ako v prvej variante;
- nanočastica je ako celok pohltaná bunkou a dostáva sa do mitochondrií⁵, tak môže ich činnosť buď citeľne narušiť alebo ich úplne vyradiť z činnosti.

Je zrejmé, že tieto možnosti sú alarmujúce a preto je potrebné venovať pozornosť testovaniu vplyvov nanočastíc na ľudský organizmus, či skutočne môžu spôsobiť podobné reakcie.

2.3.3 Toxické splodiny z výroby nanočastíc

Vedľa škodlivosti samotných nanočastíc sa nesmie zabúdať ani na zdravotné riziká vznikajúce už pri ich výrobe.

Skupina amerických vedcov na zasadaní Americkej chemickej spoločnosti zverejnila výsledky výskumu, ktorý identifikoval radu toxických a rakovinotvorných splodín z výroby uhlíkových nanotúb. Štúdium možných rizík nanotechnológií sa sústreďovalo prevažne na výskum priameho ohrozenia zdravia samotnými nanočasticami. Štúdie prevádzané na myšiach už ukázali, že NP môžu poškodzovať pľúca. Ale znalosti vedy zatiaľ nestačia k stanoveniu rizika pre zdravie ľudí. Ešte menej boli vedcom známe účinky vedľajších produktov alebo odpadov z ich výroby. Preto sa americkí výskumníci sústredili na analýzu splodín, ktoré vznikajú ako nežiadúce vedľajšie produkty pri výrobe uhlíkových nanotúb.

Meranie prevádzali v malom laboratórnom zariadení pre výrobu CNTs a identifikovali najmenej 15 aromatických uhlíkovodíkov. Ich nebezpečné vlastnosti boli preukázané napr. pri štúdiu poškodenia zdravia cigaretovým dymom alebo výfukovými plynmi áut. Pri výrobe CNTs boli identifikované tiež rakovinotvorné látky a škodliviny schopné podieľať sa na vzniku fotochemického smogu i na formovaní prízemného ozónu, ktorý poškodzuje dýchacie cesty človeka i rastlín, vrátane poľnohospodárskych plodín.

Mechanizmus poškodenia pľúc nanočasticami, ktoré pochádzajú z procesu spaľovania, je prevažne spôsobený oxidačným stresom. To vedie k poškodeniu buniek a zápalu pľúc. Zápal má potom vplyv na radu patologických procesov ako je ochorenie dýchacích ciest, kardiovaskulárne ochorenia, fibróza, alebo rakovina [42].

⁵ **mitochondria** – bunková organela (časť každej bunky), je dýchacím a energetickým centrom bunky, zaisťuje premenu látok a dýchanie bunky [22]

Výskumné tímy sa pokúšajú nájsť efektívnu stratégiu, ako urobiť výrobu CNTs ekologicky bezpečnejšou. Ide o zmeny technológie tak, aby sa znížilo množstvo toxických splodín a tiež napr. o použitie špeciálnych filtrov, ktoré by nebezpečné splodiny zachytávali [30].

2.3.4 Nebezpečné vlastnosti nanovláken

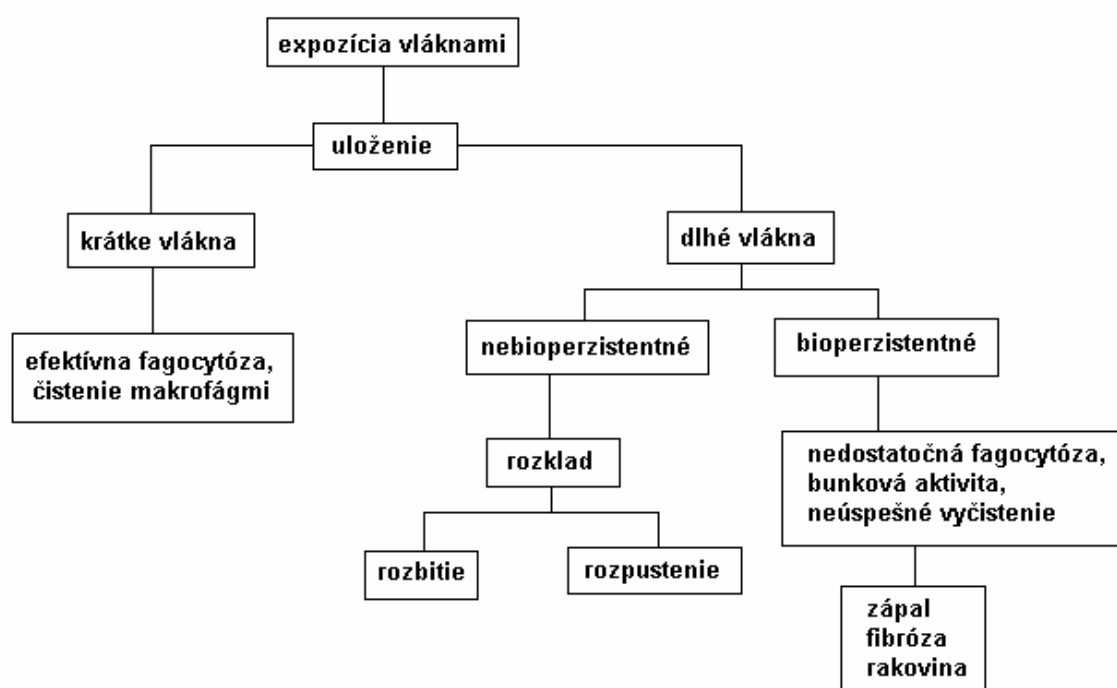
Už pár rokov je známe, že nanočastice môžu ľahko preniknúť do ľudského tela. Najpravdepodobnejšou oblasťou je dýchací systém, ale aj krvný obeh, výstelka bunky, pľúca, tráviaci trakt a pokožka. Bolo preukázané, že nanočastice sú biologicky aktívnejšie než väčšie častice, pretože majú väčší merný povrch. Ako sú nanočastice vstrebávané do organizmu, ako sú metabolizované, ako toxicky pôsobia a ako sú z organizmu vylučované, závisí na ich fyzikálno-chemických vlastnostiach (veľkosť, tvar, povrch, chemické zloženie atď.).

Táto práca je zameraná na vlákna, resp. nanovláka a preto bude ďalšia časť venovaná už konkrétne im.

Dôležitou vlastnosťou vláken je ich bioperzistencia. Je to schopnosť vláken vdychnutých do pľúc pretrvávajúť v prostredí ľudského organizmu bez ohľadu na mechanizmy fyziologického odbúravania, akými sú napr. makrofágy alebo pôsobenie pľúcnej tekutiny. Testovania materiálov ukázali, že so zvyšujúcou sa bioperzistenciou sa výrazne zvyšuje riziko karcinogenity skúmaných látok.

Ďalšou veľmi dôležitou vlastnosťou s ohľadom na zdravotné riziká vláken a nanovláken vniknutých do ľudského tela je ich dĺžka. Je to vlastnosť, ktorá moduluje ich patogenitu. Dlhé vlákna môžu byť definované ako vlákna, ktoré výrazne prekračujú veľkosť makrofágov a zvyčajne sú dlhé 10 – 20 mikrometrov. Dlhé vlákna sú preto pomalšie odstránené z pľúc ako kratšie vlákna, ako bolo dokázané v niekoľkých štúdiách [43, 49]. Preto, s prebiehajúcou expozíciou, dávka dlhých vláken sa bude hromadiť viac, než u rýchlejšie odstrániteľných krátkych vláken. Samozrejme, dávka nie je jediným vysvetlením pre vyššiu patogenitu dlhých vláken. V in vitro štúdiách [28, 75], dlhé vlákna mali oveľa výraznejšie zápalové účinky ako krátke vlákna. Tu sa teda jedná o "dvojitý zásah", ktorý je spôsobený dĺžkou vláken a tým, že dlhé vlákna sú viac biologicky aktívne ako krátke vlákna, keď nadväzujú kontakt s bunkami.

Rozdiely v štruktúre vlákien stanovujú rozdiely v ich schopnosti odolávať chemickému pôsobeniu v pľúcach. Keď sú vlákna ošetrované in vitro soľnými roztokmi, ktoré sú typické u týchto biologických systémov, vlákna sa líšia vo svojej "odolnosti", tj., niektoré typy vlákien podstúpia rozpustenie a to tak, že sa buď rozbijú na menšie kúsky alebo sa úplne rozpustia. Iné druhy vlákien, ako napr. azbest, odolávajú rozpadu. V pľúcach sú tieto rozdiely odrazené v tendencii dlhých vlákien z nebioperzistentného materiálu úplne sa rozpustiť alebo rozdeliť do kratších vlákien, ktoré môžu byť odstránené. To znamená, že škodlivými dávkami vlákien v pľúcach sú dlhé bioperzistentné vlákna. To má byť ukázané na obr. 7 [42].



Obr. 7: Príklad úlohy bioperzistencie dlhých a krátkych vlákien [42].

Zvláštne obavy vyvoláva zrejماً schopnosť, že nanočastice sa premiestňujú z miesta ich usadenia. Preto, po inhalačnej expozícii, NP cestujú cez nervy v nose do mozgu, ako bolo popísané u detskej obrny [26], a tak získajú prístup do krvi a do iných orgánov. Pre NP, ktoré sú vyrobené a spracované vo veľkom, je potenciál pre expozíciu pľúc. U niektorých NP, ako sú tie v opaľovacích krémoch, sa už vyskytli dermálne expozície a rozsah rôznych NP v kozmetike sa pravdepodobne zvýši. Navyše, obrovská trieda NP je navrhnutá tak, aby bola zavedená priamo do tela z diagnostických a terapeutických dôvodov. Je však potrebné upozorniť, že chémie a vlastnosti týchto rozličných tried NP sú veľmi rozmanité a je

pravdepodobné, že aj keď niektoré môžu byť toxické, iné, vysielané napr. na doručovanie liečiv, môžu mať relatívne nízky toxický potenciál [42].

Uhlíkové nanotuby patria v dnešnej dobe medzi najznámejšie nanovláknenné materiály a tak sa časť tejto kapitoly venuje práve ich zdravotným rizikám.

Vedecký časopis *Environmental Health Perspectives* publikoval prácu skupiny švajčiarskych vedcov [30], ktorá mapuje znalosti súčasnej vedy o pôsobení uhlíkových nanotúb na ľudské zdravie a životné prostredie. Uhlíkové nanotuby sú v životnom prostredí biologicky dostupné pre živé organizmy. Vlastnosti CNTs naznačujú ich schopnosť dlhodobo pretrvávajúť v životnom prostredí (vysoká perzistencia) a hromadiť sa v potravinových reťazcoch (bioakumulácia). Tieto vlastnosti vzbudzujú značné obavy lekárov i ekológov, pretože práve perzistentné a bioakumulatívne látky (dioxíny, PCB, DDT, chlórované pesticídy, brómované spomaľovače horenia atď.) patria medzi tie, ktoré v minulosti spôsobili vážne poškodenie zdravia ľudí a významné škody na životnom prostredí [30].

Ďalšou vlastnosťou CNTs je, že sa spájajú do "povrazov" kvôli van der Waalsovým silám. Tieto zväzky obvykle obsahujú mnoho desiatok nanotúb a môžu byť podstatne dlhšie a širšie ako nanotuby, z ktorých sa skladajú. To je veľmi dôležitý faktor modifikujúci toxicitu [42]. Uhlík ako taký je materiál, ku ktorému je ľudský organizmus inertný (nereaguje naňho), ale v takto extrémne malých rozmeroch hrá úlohu obrovský povrch nanomateriálov a tiež relatívne vysoká chemická reaktivita hlavne koncov nanotúb. Štúdia Lin et al. [25] popisuje body v štruktúre CNTs, ktoré sú viac reaktívne ako ostatné, ako sú napr. poruchy v dôsledku chýbajúcich atómov uhlíka a väčšieho napätia v zakončeníach nanotúb. Menšie CNTs sú viac "napäté", pretože sa líšia od ideálnych planárnych štruktúr grafitu. Rafinované nanotuby pravdepodobne obsahujú ďalšie chyby v podobe zvyškov karboxylových kyselín (-COOH). Vzorka CNTs vždy obsahuje určité množstvo nečistôt (kovy, organické látky a podporný materiál). Co, Fe, Ni, a Mo a ich zmesi sú najčastejšie používané kovy v syntéze CNTs, Mo sa často používa ako prísada k podpore rastu SWNTs [42]. Nie je ale presne zistené, aké to má následky na zdravie človeka [34].

V niekoľkých štúdiách [42, 33] majú CNTs viac nežiadúcich účinkov ako rovnaké množstvo nanočastíc uhlíka a kremeňa, ktoré sú bežne užívané ako meradlo toxicity. Nanotuby sú vyrábané stále dlhšie a tak definitívne spĺňajú požiadavku na dĺžku, keď sú dlhšie ako 15 μm . V podstate sú grafitové, takže nie sú rozpustné v neutrálnom alebo mierne kyslom pH a sú tak potenciálne bioperzistentné. Navyše, ich tendencia, že sú kontaminované

kovmi, môže prispieť k vytvoreniu zápalov a toxicity. Ak sú vdychované CNTs dlhšie ako 20 µm, potom, obdobne ako u minerálnych a sklenených vlákien, je možné očakávať, že budú spôsobovať rovnaké typy patológie, ako spôsobujú dlhé bioperzistentné vlákna u potkanov a ľudí, pokiaľ je počet vlákien dostatočný. Tieto patológie sú fibróza, rakovina, pleurálne zmeny, mezotelióm⁶ a iné [42].

V marci 2004 vykonala ekotoxikologické testy pracovníčka univerzity v Texase Eva Oberdörster a potvrdila rozsiahle poškodenie mozgu rýb exponovaných fullerenmi⁷ po dobu 48 hodín pri premenlivom dávkovaní porovnateľnom s koncentráciou ostatných znečisťujúcich látok na pobreží. Napadnutá bola tiež pečeň rýb a indikovaná zmena celkovej fyziológie. Počas paralelného testu fullereny usmrtili taktiež niektoré kôrovce ako článok morského potravinového reťazca. Doposiaľ sa však nepodarilo potvrdiť, či by fullereny dokázali poškodiť aj mozog človeka [33].

Sklenené vlákna (SVFs) síce nepatria medzi nanovlákná, ale zahŕňajú veľmi širokú škálu anorganických vláknenných materiálov, ktoré sú často testované kvôli ich možnému riziku usadzovať sa po vdýchnutí v pľúcach.

SVFs sa rozdeľujú do troch skupín založených na zložení. Sú to: sklená vata, minerálna vata (rock wool - kamenná, stone wool – oceľová, slag wool – trosková) a žiaruvzdorné keramické vlákna [44]. Za viac ako 50 rokov bol toxikologický potenciál SVFs extenzívne preskúmaný s použitím ľudských epidemiologických a rôznych laboratórnych štúdií. Väčšina syntetických sklenených vlákien (MMVFs – man-made vitreous fibers), tiež známych ako syntetické minerálne vlákna (MMMF – man-made mineral fibers) sa používajú ako tepelná a zvuková izolácia. Stone wool sa používa prevažne v Európe. V posledných rokoch HT stone wool, so zvýšeným obsahom hliníka a zníženým obsahom kremíka a so zníženou bioperzistenciou, čoraz častejšie nahrádza tradičnú stone wool [58]. Nepriaznivými účinkami MMVFs sú mechanické podráždenie kože spôsobené trením hrubými vláknami a prípadné riziko vzniku respiračných ochorení, vrátane rakoviny pľúc, po dlhodobej expozícii vdýchnuteľnými vláknami. Ďalej sú tu zahrnuté pretrvávajúce chronické zápal, fibróza a bunková proliferácia v pľúcach a vznik mezoteliálneho obloženia. Existuje jednoznačný vzťah medzi pretrvávajúcim zápalom, fibrózou a vývojom nádoru

⁶ **mezotelióm** - vzácna a agresívna forma malígneho nádoru blán vystielajúcich teľné dutiny, postihuje väzivovú blanu pokrývajúcu pľúca (popľúcnicu), výstelku brušnej dutiny (pobrušnicu) alebo srdcový sval [19]

⁷ **fulleren** – látky tvorené molekulami, ktoré sú zložené z niekoľkých atómov uhlíka a tieto atómy predstavujú mnohosteny guľovitého tvaru [10]

na zvieracích modeloch [60]. Patogénne vlákna ako azbest spôsobujú ťažkú pľúcnu fibrózu (azbestózu) rovnako ako aj pľúcny karcinóm. V štúdiách na zvieratách [61], rôzne MMVFs preukázali spojitosť zápalov a fibrózy s vážnymi dôsledkami s bioperzistenciou vláken. Bioperzistencia vláken uložených v dýchacích cestách vyplýva z kombinácie fyziologicko-čistiacich procesov (mechanické translokácie/odstránenie) a fyzikálno-chemických procesov (chemické rozpustenie a vyplavovanie, mechanické rozbitie) [58]. Vzhľadom k tomu, že dlhé vlákna majú väčšiu biologickú aktivitu a sú viac patogénne ako tie kratšie, testy sa sústreďujú u zvierat na tieto vlákna [52].

Oxid titaničitý a selenid kademnatý síce nepatria medzi nanovlákná, ale v poslednej dobe sú to veľmi často používané nanomateriály a preto je tu uvedená aspoň nasledujúca zmienka.

Oxid titaničitý je súčasťou mnohých produktov ako sú pleťové vody, opaľovacie krémy alebo farbivá pre domácnosť. Jeho nanočastice sú vysoko reaktívne, pretože generujú tzv. voľné radikály, ktoré môžu zlikvidovať aj baktérie. Z tohoto dôvodu sa vedci obávajú vplyvov nanočastíc najmä na pôdnu mikroflóru. Čo sa týka opaľovacích krémov, zatiaľ nebolo preukázané, že by tieto nanočastice prechádzali do zdravej pokožky. Je tu však možnosť preniknutia nanočastíc kožou poranenou alebo poškriabanou.

Nanočastice selenidu kademnatého boli skúmané na svoj nepriaznivý dopad na človeka aj na univerzite v San Diegu začiatkom roku 2002. V roku 1997 vedci z Oxfordu objavili NP používané v opaľovacích krémoch, ktoré poškodzovali DNA. Menšie častice interagujú so živým organizmom a dochádza k ich prestupu pokožkou, pľúcami, krvou alebo mozgom, pričom sa tvoria voľné radikály, ktoré usmrťia živé bunky. V pľúcach môžu kovové nanočastice vyvolávať astmatické alebo iné vážne dýchacie problémy príp. fibrózy alebo Alzheimerovu chorobu. Ďalšou potenciálnou hrozbou je spájanie nanočastíc s toxickými pesticídmi alebo s emisiami z elektrární, spaľovní, cementární, z dieselových motorov. Tie produkujú tieto ultrajemné spaliny, údajne 10 až 50-krát škodlivejšie pre pľúca ako väčšie častice. Ich obrovský povrch môže adsorbovať nebezpečné toxíny rozptýlené v životnom prostredí. Len v USA je takto exponovaných asi 2 milióny robotníkov zamestnaných v podnikoch vyrábajúcich nanomateriály. Jedni prirovnávajú NP k vlastnostiam azbestového prachu, iní tvrdia, že po akumulácii v ľudskom tele vyvolávajú rakovinu [33].

2.4 Metódy testovania nanovláknenných materiálov s ohľadom na ich možné riziká

Pre určenie rizika vzniku nádorových ochorení po prieniku vlákien do ľudského tela sú zatiaľ najviac popisované v literatúre nasledujúce dve metódy, ktoré sú založené na sledovaní odbúravania vlákien. Sú to metódy *in vitro* a *in vivo*.

Metóda *in vitro* - používa sa v oboroch pracujúcich s organizmami a ich časťami v umelých podmienkach laboratórií (skúmavky, Ehrlen-Mayerove banky, Petriho misky atď.) Na zisťovanie bioperzistencie vlákien v pľúcach sa používa simulovaná pľúcna tekutina (SLF – simulated lung fluid), ktorá simuluje buď extracelulárne prostredie v pľúcach (pH 7,4) alebo intracelulárne prostredie vo vnútri makrofágov (pH 4,5). Rozpustenie vlákien je možné určiť buď priamym meraním straty hmotnosti vlákien alebo z merania zmeny priemeru vlákien po aplikácii v SLF. Testovanie prebieha buď za statických alebo dynamických podmienok. Statické testovanie je bez výmeny roztoku, dynamické je pomocou prietokového testu [36].

Metóda *in vivo* - sleduje bioperzistenciu vlákien v prirodzených podmienkach, teda v orgánoch, bunkách, či priamo v organizme pokusných zvierat (najčastejšie potkany, myši). Za nekarcinogénne sú pokladané materiály, u ktorých vymizne polovica dlhých vlákien (dĺžka > 20 μm) do desiatich dní, v prípade intratracheálnej aplikácie do štyridsiatich dní. Táto metóda sa väčšinou používa u vlákien, ktoré prešli skúškami *in vitro* [36].

Pracovné lekárstvo je preplnené príkladmi vystavenia vdýchnuteľných častíc prachu spôsobujúcich choroby a tak boli otázky bezpečnosti zamerané z veľkej časti na nanočastice, čo predstavuje len jeden aspekt nanotechnológií. U NP sú obavy, pretože môžu vstúpiť do tela cez pľúca, kožu alebo črevá v závislosti na type expozície. Existuje predstava, že NP môžu získať prístup ku krvi. To predstavuje relatívne novú časť toxikologického problému, tj. účinky častíc sú aj na iných miestach, ako sú pľúca [42].

Materiály obsahujúce azbest, alebo novšie materiály, ktoré sú vo vývoji, ako sú syntetické organické vlákna a uhlíkové nanotuby, môžu mať rôzne formy toxikológie. Existujúci príklad silikátových vlákien naznačuje, že vdýchnuteľné druhy vlákien sa líšia vo svojej schopnosti spôsobiť ochorenie pľúc a že to môže byť chápané v závislosti od dĺžky vlákna a ich bioperzistencie v pľúcach. Vzhľadom k tomu, že vlákna sú regulované na základe počtu vlákien a nebezpečenstvo je chápané práve na základe počtu dlhých vlákien,

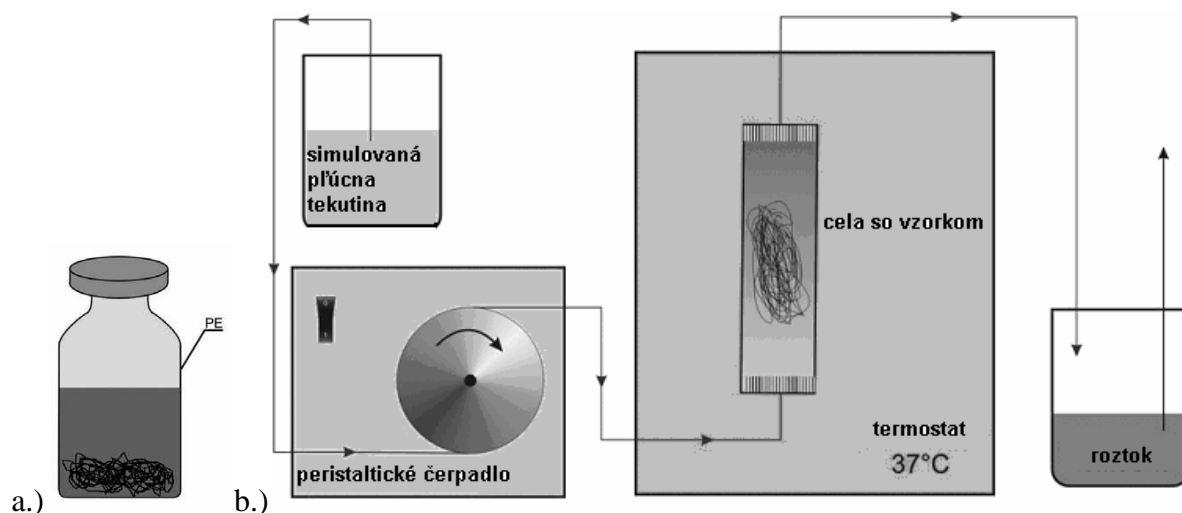
vlákna z testovacej dávky by mali byť vždy vyjadrené ako počet vlákien, nie ich objemom; distribučná dĺžka a priemer musia byť tiež známe. Krátkodobé biologické testy by mohli byť falošne pozitívne v prípade dlhodobej nebioperzistencie vlákien, pretože aj keď môžu mať účinky *in vitro*, nezotráva dostatočná dávka v pľúcach dosť dlho na vybudovanie a vytvorenie účinkov pre *in vivo*. Bioperzistencia vlákien je preto kľúčovým faktorom, ktorý predpovedá vláknu patogenitu (choroboplodnosť) [55].

2.4.1 Testovanie elektrostaticky zvláknených nanovláken

Súčasná literatúra neobsahuje veľa publikácií o metódach testovania elektrostaticky zvláknených nanovláken. Tieto vlákna sú ale bežne využívané v mnohých odvetviach a preto by sa im mala tiež venovať dostatočná pozornosť.

V článku [20] sú testované elektrostaticky zvláknené kremičité nanovlákná pripravené metódou sol-gél. Týmto termínom je označovaná skupina postupov prípravy sklenených, sklo-kryštalických alebo kryštalických materiálov, ktorých spoločným znakom je homogenizácia východných zložiek vo forme roztoku, ich prevod na sol a následne na gél pri zachovaní homogenity. Východnými surovinami pre prípravu týchto koloidných roztokov sú najčastejšie alkoxidy kovov, kvôli ich ľahkej reakcii s vodou. Najviac používanými alkoxidmi kovov sú alkoxysilany, napr. tetrametoxysilan (TMOS) a tetraetoxysilan (TEOS), alebo alkoxytitanáty (tetra-n-butylortotitanát). Vedľa alkoxidov sa používajú aj iné anorganicko-organické zlúčeniny (napr. acetylacetonáty), anorganické soli (napr. chloridy, dusičnany) alebo stabilizované vodné soli (napr. Ludox, Tosil). Publikácia [20] používa pri výrobe kremičitých nanovláken alkoxidy.

Za účelom sledovania rozpustnosti boli nanovlákná podrobené testom v destilovanej vode s pH upraveným pomocou TRIS (tris(hydroxymetyl)aminometán) a HCl na hodnotu 7,4. Tento korózný roztok môže v prvom priblížení simulovať prostredie extracelulárnej pľúcnej tekutiny. Pre meranie rýchlosti rozpúšťania boli použité dve usporiadania testov (obr. 8). Pri statickom teste boli nanovlákná vložené do polyetylénovej nádoby so simulovanou pľúcnou tekutinou a ponechali sa tam pri teplote 37 °C. U dynamickej metódy bol použitý prietokový test, ktorý viac približuje chovanie pri prieniku nanovláknenných materiálov do ľudského tela a tým eliminuje nedostatky testu statického. Váhový úbytok u oboch testov bol získavaný po 48.-ich hodinách a po 7.-ich dňoch.



Obr. 8: Schematické usporiadanie a.) statického a b.) dynamického testu rozpúšťania vlákien v simulovanej pľúcnej tekutine [36].

Pri dynamickom a statickom teste rýchlosť rozpúšťania nanovláken v simulovanej pľúcnej tekutine naznačuje, že polčas rozpadu nanovláken ($t_{0,5}$) je 7 dní a rýchlosť rozpúšťania sa pohybovala v rozmedzí 43 až 104 $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$. Týmito hodnotami sa nanovlákná blížila materiálu HT stone wool, ktorý je považovaný za bezpečný [53].

Vzhľadom k tomu, že u kremičitých vlákien získaných elektrostatickým zvlákňovaním metódou sol-gél sú rýchlosti rozpúšťania blízko spodnej hranice rýchlostí považovaných za bezpečné, bolo by vhodné overiť reprodukovateľnosť testov ďalšími testami in vitro, príp. vylúčiť ich nebezpečnosť testmi in vivo.

Práca [10] testuje karbonizované nanovlákná elektrostaticky zvlákňované z roztoku PVA statickou metódou in vitro. Ako korózne médium bola použitá simulovaná pľúcna tekutina s hodnotou pH 4,5, ktorá odpovedá intracelulárnemu prostrediu vo vnútri makrofágov.

Vzorky nanovláken boli zvážené a vložené do Ehrlen-mayerových baniek (so zaobráneným uzáverom) so simulovanou pľúcnou tekutinou. Následne boli vložené do termostatu s vodou, ktorej teplota bola po celý čas testovania udržiavaná na hodnote 37 °C. Vzorky boli ponechané v týchto podmienkach 10 dní. Potom boli niekoľkokrát prepláchnuté destilovanou vodou, prefiltrované cez filtračný papier a sušené v sušiarňi pri 100 °C 2 hodiny.

V prevedenom teste došlo k minimálnemu úbytku hmotnosti $12 \pm 3 \%$. Za nekarcinogénne sú považované vlákna, ktorých sa rozpustí aspoň polovica za dobu

desiatich dní [36]. To naznačuje, že karbonizované PVA nanovlákná by mohli byť potencionálne nebezpečné pri ich vdýchnutí. Je však ťažké posudzovať karcinogenitu z jedného testu. Preto by mali ešte nasledovať testy in vivo. Rovnako je otázne, či sú metódy bežne používané u vlákien klasických rozmerov vhodné a platné aj pre nanovlákná.

2.4.2 Testovanie nebezpečnosti uhlíkových nanotúb – in vivo

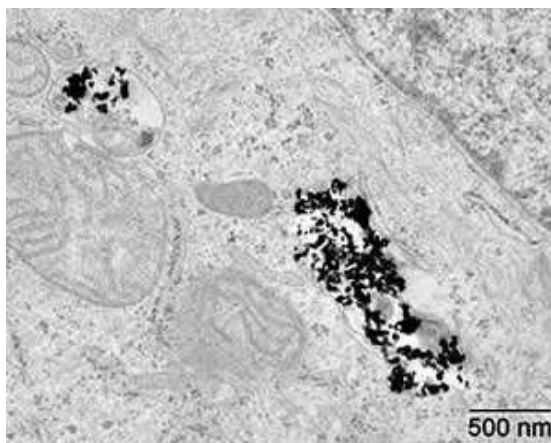
Táto diplomová práca už v predchádzajúcich kapitolách pojednávala o vlastnostiach, výrobe, použití aj o možných zdravotných rizikách uhlíkových nanotúb. Tak isto je dôležité ich testovanie, či už metódami in vitro alebo in vivo. V nasledujúcom texte je uvedených niekoľko publikácií [31, 32, 42, 64] zameraných práve na metódy in vivo testovania CNT_s.

V prvých pokusoch [31] testovania nanotúb výskumní pracovníci z Texasu vstrekli chemicky neupravené uhlíkové nanotuby priamo do krvného riečišťa laboratórneho zvieraťa. Neboli zaznamenané žiadne okamžité nepriaznivé účinky na jeho zdravie a po čase sa vylúčili pečeňou. Mnoho výskumných pracovníkov tým získalo nádej, že by CNT_s mohli byť užitočné v diagnostike a liečbe ochorení.

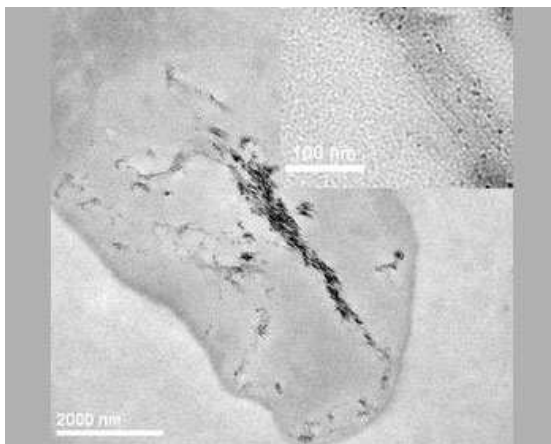
Ďalší článok [32] zahŕňa nedávno zverejnené štúdie in vivo u potkanov. Možné riziká inhalácie nanotúb neboli dostatočne zhodnotené. Pľúcna toxicita SWNT_s bola porovnaná s časticami kremeňa. Po vystavení bolo vyhodnotené pľúcne tkanivo po 24 hodinách, 1 týždni, 1 mesiaci a 3 mesiacoch od inhalácie. Výsledky naznačili, že 5 mg/kg SWNT_s spôsobilo smrť 15 % infikovaných potkanov do 24 hodín po inhalovaní, kvôli mechanickému zablokovaniu dýchacích ciest. Častica kremeňa mala za následok trvalý pľúcny zápal, cytotoxicitu, nekontrolovateľné delenie buniek a fibrotické účinky. Fyziologický význam týchto zistení je, že nanotuby majú silný sklon k nahromadeniu po inhalácii. Makrofágy ale môžu byť schopné pohltienia veľkého zhluku nanotúb ako jedného subjektu. Všetky ukladané častice vstupujú do hlienu alebo epitelovej tekutiny v žalúdku a tak je úloha tejto tekutiny dôležitá a mala by byť riešená v rámci štúdií toxicity. Epitelová tekutina obsahuje povrchovo aktívne látky a proteíny, ktoré by mohli podporiť rozptyl CNT_s, vrátane odlupovania alebo rozpadu väčších zhlukov. Predbežné hygienické štúdie in vitro ukazujú, že existuje značný stupeň zhlukovania CNT_s aj vo vzduchu [42].

Uhlíkové nanotuby ale i ostatné nanovláknenné materiály s dostatočne krátkou dĺžkou (desiatky - stovky μm) môžu prenikať nielen dýchacím systémom do organizmu človeka, ale

aj kožou, a to poškodenou, poranenou alebo nedostatočne vyvinutou u novorodencov do jedného roku života (obr. 9), očným tkanivom alebo tráviacim traktom. Hlavný problém je, že sú tak malé, že môžu prechádzať stenami buniek (obr. 10) a krvným obehom až do mozgu. Autori článku ďalej dokazujú, že pravdepodobnosť zabitia bunky nanotubami závisí na dávke (množstve) a na dobe kontaktu bunky s nanotubou [35].



Obr. 9: Prenikanie zhlukov uhlíkových nanotúb nedostatočne vyvinutou kožou u novorodencov do jedného roku života [35].



Obr. 10: Prechod zhluku uhlíkových nanotúb cez steny bunky z 24. 11. 2007 [34].

Skoršie štúdie karcinogenity s veľmi jemnými sadzami a TiO_2 boli skomplikované kvôli preťaženiu pľúc potkanov a kvôli nešpecifickým výsledkom z pľúc potkanov [62, 71]. Avšak, nedávno bolo preukázané, že nízka (1000 mg/m^3) krátkodobá (7 h) expozícia sadzami NP spôsobuje mierne zápalové účinky v pľúcach potkanov [63]. Zápalové účinky nanočastíc boli popísané v sérii in vitro modelov [64], rovnako ako ich schopnosť generovať reaktívne kyslíkové druhy (ROS) a oxidačný stres [65, 72]. Navyše, NP bránili fagocytóze⁸ [66] a

⁸ **fagocytóza** - schopnosť špecializovaných buniek imunitného systému vyhľadať, pohltiť, usmrtiť a rozložiť mikroorganizmy, starnúce bunky a ďalší materiál [21]

zvyšovali citlivosť makrofágov. Veľmi malé častice a štruktúry môžu mať celú radu ďalších účinkov, ktoré nie sú vidieť u konvenčných častíc. Napr., nemôžu byť detekované bežnou fagocytickou obranou, to im umožňuje, aby získali prístup do krvi alebo do nervového systému. Veľmi malé častice sú menšie ako molekuly a mohli by spôsobiť zmenu štruktúry bielkovín: buď zmenou ich funkcií, vyradením ich antigénu⁹ alebo zvýšením potenciálu u autoimunitných účinkov [42].

V in vivo štúdiách sa zatiaľ nikto nezameral na úlohu dĺžky v tom zmysle, že nikto neporovnáva dlhé (viac ako 20 μm) a krátke (menej ako 10 μm) CNT_s. Hoci existuje niekoľko in vitro štúdií u rôznych modelov, žiadna bioperzistenčná štúdia nebola vykonaná. Lam et al. [67] preukázali, že jediné intratracheálne nakvapkanie u myší s troma rôznymi typmi SWNT_s má za následok v závislosti na dávke epiteliálny granulóm¹⁰ a niektoré závery hovoria aj o medzitkanivovom zápale. Žiadna distribúcia veľkostí CNT_s však nebola uvedená. Boli použité NP kremíka a uhlíka s rovnakými hmotnostnými dávkami a autori došli k záveru, že na základe rovnakej hmotnosti, SWNT_s boli v pľúcach ďaleko viac toxické ako sadze a kremeň. Toxicita bola porovnaná s kremeňom a nanotuby spôsobili rozsiahle granulómy a fibrózy. Vzorky nanotúb mali odlišný obsah kovov, napr. Fe a Ni, ale to nevedlo k rozdielom v ich schopnosti produkovať granulóm, takže kovmi nemožno vysvetliť tento efekt. Warheit et al. [68] hodnotili akútnu pľúcnu toxicitu intratracheálneho nakvapkania SWNT_s, ktoré boli 1,4 nm široké a menej ako 1 μm dlhé a obsahovali výrazné množstvo Ni, Co a amorfný uhlík. V tejto štúdii sa ukázalo, že expozícia SWNT_s spôsobuje prechodný zápal a nezávisle na dávke aj multifokálny granulóm. Müller et al. [69] exponovali potkanov intratracheálne celými alebo mletými MWNT_s dlhými 0,7 a 5,9 μm a charakterizovali ich biologickú aktivitu. Dlhé nerozomleté nanotuby boli viac bioperzistentné ako krátke nanotuby počas 60.-tich dní. Hoci je to v súlade s vyššou bioperzistenciou dlhých vlákien spozorovanou v štúdiách s azbestom a inými minerálnymi vláknami, je potrebné poznamenať, že tieto dlhé CNT_s boli oveľa kratšie ako minerálne vlákna definované ako dlhé s dĺžkou 20 μm . CNT_s boli vysoko fibrogénne a zápalové, približne ekvivalentne s chryzotilovým azbestom a aktívnejšie ako NP sadzí [69]. Rozomleté CNT_s boli vcelku aktívnejšie ako nerozomleté a to môže byť výsledok väčšieho rozptylu dávky v pľúcach.

Shvedova et al. [70] študovali myši vystavené SWNT_s s 99,7 hmotnostným percentom elementárneho uhlíka a s 0,23 hmotnostným percentom železa. Uhlíkové nanotuby boli

⁹ **antigén** - každá látka (molekula), ktorú imunitný systém organizmu rozpoznáva ako telu cudzí a nejakým spôsobom na ňu reaguje [42]

¹⁰ **granulóm** – ohraničený chronický zápal vyvolaný napr. baktériami alebo cudzím telesom [22]

v priemere 1 – 4 nm. Po vdýchnutí boli pozorované dve odlišné morfológie častíc: kompaktné zhluky a rozptýlené štruktúry, ktoré boli spojené s dvoma odlišnými reakciami. Husté zhluky SWNT_s vyvolali granulomatózný zápal a rozptýlené štruktúry medzitkanivovú fibrózu. Kontrolované myši prijali sadze alebo kremeň, ale to nespôsobilo zhrubnutie alveolárnych stien a nevyvolalo tvorbu granulómu [42].

Uhlíkové nanotuby tvoria dôležitú skupinu nanovláknenných materiálov, ktoré však môžu potencionálne ohrozovať zdravie človeka. Je potrebné venovať pozornosť ďalším testom, aby sa riziká buďto vyvrátili alebo v horšom prípade potvrdili a prijali sa potrebné opatrenia.

2.4.3 Testovanie nebezpečnosti sklenených vlákien – in vivo

Z vlákenných materiálov sú najviac testované vlákna sklenené. U nich bolo očakávané najväčšie riziko pre zdravie. Testy týchto vlákien sú v tejto kapitole popísané podrobnejšie, pretože sú to najčastejšie publikované testy zdravotných rizík vlákenných materiálov a je možné ich použiť ako model napr. pre testovanie elektrostaticky zvláknenných nanovláken.

V roku 2001 pracovná skupina IARC opätovne precenila karcinogénne riziko syntetických sklenených vlákien (MMVFs). V porovnaní s hodnotením IARC z roku 1987, celkové hodnotenie o izolácii sklenej vaty, stone wool a slag wool boli zmenené zo skupiny 2B na skupinu 3. Tieto zmeny vyplynuli zo zmien v dôkazoch rakoviny u ľudí a u pokusných zvierat. Namiesto "dostatočné", dôkazy rakoviny u pokusných zvierat sú teraz vnímané ako "obmedzené" [50].

Celkový záver IARC pracovnej skupiny bol, že stone wool nie je možné klasifikovať ako karcinogénnu pre človeka (skupina 3). Toto rozhodnutie bolo urobené, pretože neboli k dispozícii žiadne údaje o účinkoch na človeka a pracovná skupina mala ťažkosti s kategorizáciou týchto vlákien do zmysluplných skupín podľa chemického zloženia [58]. V rámci Európskej únie, MMVFs sú stále klasifikované ako Karcinogénna kategória 3 (pravdepodobne karcinogénne) a navyše ako Dráždivé (dráždia kožu) [59]. Smernica Komisie 97/69/ES, poznámka Q, umožňuje výnimku (oslobodenie) od klasifikácie na základe

niektorého z nasledujúcich testov: krátkodobé intratracheálne¹¹ alebo inhalačné bioperzistenčné testy, dlhodobé inhalačné alebo intraperitoneálne¹² testy karcinogenity [52].

Je všeobecne známe, že výsledky z dlhodobých inhalačných testov sú veľmi dôležité pre predikciu zdravotných účinkov u ľudí. Hlavné kritiky inhalačnej metodológie sa týkajú jej údajnej nízkej citlivosti v porovnaní s testom s intraperitoneálnou (ip) injekciou. Došlo ale k veľkej diskusii o vhodnosti využitia výsledkov práve zo štúdií ip injekciou. Keď sú vlákna vstreknuté do dutiny brušnej, prirodzene sa vyskytujúce mechanizmy nie sú podobné tým, ktoré sa vyskytujú v pľúcach po vdýchnutí a to popiera platnosť ip testov. Model inhalačnej štúdie má tú výhodu, že simuluje situácie, ktoré nastanú po skutočnej expozícii na pracovisku, ale vyžaduje dlhobojšie podávanie vysokej dávky vlákien. Avšak, zdá sa, že ip test je schopný detekovať nízky karcinogénny potenciál vlákna [53].

V tejto kapitole sú zhrnuté výsledky z chronickej inhalačnej štúdie a zo štúdie po intraperitoneálnej injekcii. Porovnávané sú vlákna HT stone wool a vlákna tradičnej stone wool MMVF21. HT stone wool zastupuje nové biorozpustné typy vlákien, ktoré sa vyznačujú vysokou rýchlosťou rozpúšťania pri pH 4,5 a relatívne nízkou rýchlosťou rozpúšťania pri pH 7,5. Majú vyšší obsah hliníka a nižší obsah kremíka a nižšiu bioperzistenciu ako MMVF21. Ďalej je tu spomenutá aj sklená vata, ktorá sa používa ako izolačný materiál na miestach, kde bol ešte pred pár rokmi použitý azbest. A preto by sa mal posúdiť a porovnať ich karcinogénny potenciál. Kapitolu zakončuje štúdia zameraná na určovanie rýchlosti rozpúšťania sklo-keramických vlákien pomocou in vitro testov.

2.4.3.1 Chronická inhalačná štúdia stone wool u potkanov

Výsledky chronickej inhalačnej štúdie HT minerálnej stone wool (RIF41001, RIF42020-6, RIF43006-1) boli porovnávané s výsledkami z podobnej štúdie s tradičnou stone wool MMVF21. Samci potkanov rodu Wistar boli vystavovaní štyrom rôznym skupinám syntetických sklenených vlákien v nosovej inhalácii. Chemické zloženia sú uvedené v tab. 1. Tab. 2 uvádza strednú hodnotu priemerov a dĺžok použitých vlákien.

¹¹ intratracheálne – dovnútra priedušnice [22]

¹² intraperitoneálne – v dutine brušnej [22]

Tab. 1: Chemické zloženie vlákien podľa hmotnostného percenta [52].

	RIF41001 [hm %]	RIF42020-6 [hm %]	RIF43006-1 [hm %]	MMVF21 [hm %]
SiO ₂	42,7	36,8	40,6	45,9
Al ₂ O ₃	18,9	20,7	21,9	13,8
TiO ₂	1,6	1,4	1,6	3
FeO	6,3	5,4	5,6	6,2
CaO	18,3	18	15,6	17
MgO	7,8	10,2	10,7	9,5
Na ₂ O	1,7	4,4	1,4	2,5
K ₂ O	0,9	0,5	0,6	1,3
Ďalšie oxidy	0,2	0,9	0,5	0,4
Suma	98,4	98,3	98,5	99,4

Tab. 2: Stredná hodnota priemerov a dĺžok vlákien v mikrometroch [52].

	Priemer [μm]	Dĺžka [μm]
RIF41001	0,75	44,2
RIF42020-6	0,72	36,5
RIF43006-1	0,63	38,1
MMVF21	1,13	35,2

Štúdie boli vykonané na Fraunhofer Institute Toxicology and Aerosol Research (Fh-ITA), v Hannoveri v Nemecku, v súlade so zásadami správnej laboratórnej praxe a s protokolom EU pre vykonávanie chronickej inhalačnej štúdie s MMVFs [55].

Vek zvierat bol na začiatku expozície 9 – 10 týždňov a hmotnosť 200 – 300 g. Tridsaťdva potkanov, vrátane dvoch rezervných, bolo rozdelených do skupín na základe telesnej hmotnosti. Desať potkanov bolo pridelených pre každú post-expozičnú skupinu na zabitie. Keď neboli potkany exponované, boli umiestnené v skupinách po dvoch v polykarbonátových klietkach. Tieto štúdie boli vykonané v optimálnych hygienických podmienkach. Prostredie bolo klimatizované a malo monitorovanú teplotu 22 ± 2 °C a relatívnu vlhkosť 40 - 70 %. Striedalo sa 12 hodín umelého svetla a 12 hodín tmy.

Ako spôsob podania bola použitá inhalácia. Vlákenný aerosól bol podávaný každému zvieraťu jednotlivo a vydychovaný vzduch sa okamžite odčerpával. Pre každú nosovú expozíciu aerosólových vlákien bol vytvorený vysokotlakový pneumtický rozprašovač, ktorý bol napojený s testovanými látkami na počítačovú kontrolu, tj. so spätnou väzbou na skutočné koncentrácie aerosólov merané aerosólovým fotometrom. Prúdenie vzduchu u každého zvieraťa bolo asi 1 l/min. Prúdenie vzduchu, teplota a vlhkosť boli priebežne monitorované.

Zvieratá boli zadržiavané u polykarbonátových túb, pri otvorení tuby mali zvieratá nosy blízko prúdenia vzduchu.

Cieľová dávka bola 150 dlhých vlákien/ml (dĺžka > 20 µm) v každej skupine. Negatívne kontrolné skupiny boli vystavené filtrovanému vzduchu. Expozičná doba bola 6 h/deň, 5 dní v týždni po dobu 3 mesiacov, s následnou post-expozičnou dobou trvajúcou 3 mesiace. Potkany boli skúmané denne na klinické príznaky, chorobnosť a úmrtnosť. Telesná hmotnosť bola zaznamenaná raz týždenne počas prvých 3 mesiacov, potom každý druhý týždeň.

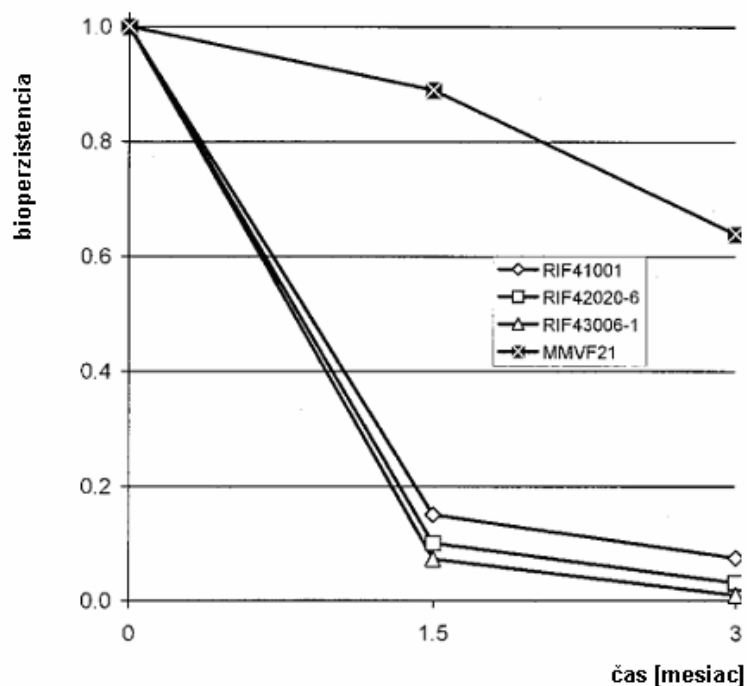
Potkany boli zabité 1 týždeň po poslednej expozícii a dodatočné post-expozičné usmrtenia boli vykonané po 1,5 a 3 mesiacoch na sledovanie progresie pľúcnych zmien a počtu vlákien v pľúcach. Hodnotenie zahŕňa bronchoalveolárny výplach tekutinou (BALF) na vyhodnotenie zápalových reakcií, meranie bunkovej proliferácie, hodnotenie ranej fibrózy, histologické vyšetrenia a porovnanie telesnej váhy a hmotnosti pľúcneho laloku.

Pre analýzu záťaže pľúc boli pravé pľúcne laloky z každého zvieraťa odstránené, zvážené a hlboko zmrazené. Potom vysušované mrazom a podrobené mineralizácii pri 400 W po dobu najmenej 6 h. Časť z pľúc bola uložená vo filtrovanej vode a miešaná ultrazvukom 1 min. Homogenita suspenzie sa kontrolovala cez flášu pred svetlom. Ak zoskupenia zostali, sonifikácia sa opakovala. Homogénna suspenzia sa prefiltrovala cez filter. Koncentrácie vlákien a veľkosť distribúcie častíc a vlákien boli analyzované SEM metódou. Z týchto údajov sa stanovil celkový počet vlákien na pravom pľúcnom laloku pre každé zviera. Celková záťaž pľúc sa vypočítala pomocou troch nameraných dát:

$$\text{Celková hmotnosť pľúc (nameraná)} / \text{hmotnosť pravého laloku (nameraná)} = \text{celkové zaťaženie pľúc (vypočítané)} / \text{zaťaženie pravého laloku (namerané)}.$$

Normalizovaný počet dlhých vlákien v celých pľúcach je tiež ukázaný v grafe č. 1 a ilustruje odstránenie dlhých vlákien v závislosti na čase a dokazuje vyššiu bioperzistenciu vlákien MMVF21. Maximálne zaťaženie pľúc bolo dosiahnuté podstatne nižšie v HT skupinách než v MMVF21 skupinách [52].

Graf č. 1: Odstraňovanie dlhých vlákien z pľúc potkanov v závislosti na čase [52].



Priemerná hmotnosť pľúc v MMVF21 exponovaných skupinách ukázala štatisticky významné zvýšenie v porovnaní s kontrolnými skupinami. Výrazný nárast hmotnosti pľúc bol v MMVF21 skupine, ale nie v HT skupinách. U všetkých vlákien došlo k zníženiu v hodnotách priemeru a dĺžky aerosólových vlákien.

Predchádzajúce krátkodobé (5 dní) inhalačné štúdie bioperzistencie s HT vláknami mali polčas rozpadu krátkych vlákien 25 dní a dlhých vlákien ($L > 20 \mu\text{m}$) 6 dní. Odstránenie stone wool (MMVF21) bolo oveľa pomalšie, s polčasom rozpadu 65 dní (krátke vlákna) a 92 dní (dlhé vlákna). Po 3 mesiacoch inhalácie dlhých HT vlákien bol polčas rozpadu 17 dní [56].

Táto štúdia ukázala jednoznačný rozdiel medzi MMVF21 a HT so zreteľom na fibrogenický potenciál. To je v súlade s výsledkami z dlhodobej chronickej inhalačnej štúdie, kde MMVF21 indukujú pľúcnu fibrózu a HT nie a so zvýšenou biorozpustnosťou vlákien HT v porovnaní s MMVF21 hlásenej v súvislosti s krátkodobou bioperzistenčnou štúdiou. V súčasnej 90-dennej štúdii boli patologické zmeny nájdené v pľúcach exponovaných potkanov v súlade s patológiou predtým vykazovanou pri inhalačných štúdiách. Teda, tradičná stone wool (MMVF21) spôsobila závažné patológie, vrátane pľúcnej fibrózy, kým vodorozpustné HT vlákna spôsobili málo rozpoznateľné patologické zmeny. Tieto zistenia podporujú domnienky, že 90-denná štúdia, ktorá obsahuje hodnotenie

o bioperzistencii môže byť dostačujúca pre testovanie nových vlákien. Je možné, že vedomosti o patológii vlákien dosiahli štádia, kedy sú už len údaje o bioperzistencii potrebné pre predpovede dlhodobých škodlivých účinkov u syntetických sklenených vlákien. Význam bioperzistencie bol potvrdený v štúdiu [52] a dokazuje, že zavedenie vlákien s vyššou biorozpustnosťou zvýšilo mieru bezpečnosti pri výrobe a používaní vlákenných izolačných materiálov.

2.4.3.2 Štúdia stone wool po intraperitoneálnej injekcii u potkanov

Štúdia [53] sa zaoberá výsledkami po intraperitoneálnej (ip) injekcii HT stone wool (RIF39001). Výsledky sú v porovnaní s predtým vykonanými ip štúdiami s tradičnou stone wool (MMVF21). Cieľom štúdie bolo posúdenie potenciálnych karcinogénnych účinkov po ip injekcii stone wool u potkanov a podrobné skúmanie patologických zmien na vybraných tkanivách každého zvieraťa.

Tab. 3: Chemické zloženie vlákien podľa hmotnostného percenta [53].

	RIF39001 [hm %]	MMVF21 [hm %]
SiO ₂	39,6	45,9
Al ₂ O ₃	21,5	13,8
TiO ₂	2	3
FeO	6,4	6,2
CaO	15,4	17
MgO	10,7	9,5
Na ₂ O	0,1	2,5
K ₂ O	0,8	1,3
Ďalšie oxidy	0	0,4
Suma	96,5	99,4

Tab. 4: Stredná hodnota priemerov a dĺžok vlákien v mikrometroch [53].

	Priemer [μm]	Dĺžka [μm]
HT	0,8	8,5
MMVF21	0,65	10,7

Výber vláken bol vykonaný na Johns Manville Technical Centre (JMTC) v Littleton v USA a na Fraunhofer Institute of Toxicology and Aerosol Research (Fh-ITA) v Hannoveri v Nemecku.

Potkany boli staré 10 - 12 týždňov a vážili 200 - 230 g. Zvieratá v MMVF21 štúdiu boli o niečo ľahšie, než v HT štúdiu. V HT bolo 50 skupín, v MMVF21 57 skupín. HT skupina mala 50 pokusných zvierat a MMVF21 skupina 96. Štúdie boli vykonané na základe optimálnych hygienických podmienok. Teplota v miestnosti bola 17 - 25 °C a relatívna vlhkosť 40 - 70 %. Všetky podmienky prostredia boli sledované a zaznamenávané.

Potkany boli náhodne rozdelené do jednotlivých expozičných skupín. Negatívna kontrolná skupina bola vystavená fyziologickému roztoku. Každé zviera dostalo jednu injekciu. Ako spôsob podania bola použitá intraperitoneálna injekcia. Nominálna dávka bola $0,5 \times 10^9$ vláken. Všetky prístroje používané pri príprave a injekcii sa kúpili buď sterilné alebo sa sterilizovali pred použitím. Vzorky vláken boli uchovávané v soľnom roztoku (0,9 % NaCl vo vode). Pred podaním bolo každé zviera preskúmané, aby sa zabezpečilo, že je vhodné. Každý potkan bol znecitlivený halotanom, teda kvapalným anestetikom zo skupiny halogénových uhľovodíkov. Do zvieraťa bol umiestnený intravenózný katéter vložený do peritoneálnej dutiny cez brušnú stenu. Ihla bola vložená tak, aby bola vo vnútri brucha. Suspenzia dávky sa ručne pretrepala a zamiešala po dobu 30 s. Dva mililitre suspenzie boli spracované do 2 ml sterilnej polypropylénovej striekačky, ktorá bola pripojená na katéter a jej obsah sa vstriekol do zvieraťa. Tento katéter bol starostlivo sledovaný a prípadné krvácanie alebo straty v mieste vpichu boli zaznamenané. Peritoneálna dutina bola ľahko masírovaná, kým zviera opäť neprišlo k vedomiu. MMVF21 štúdia bola podobná, ale použila sa 2,5 ml injekčná striekačka.

Po expozícii boli zvieratá zachované, až kým prežitie v skupine nekleslo pod 20 % (HT štúdia), alebo sa zvieratá zachovali, ak prežili (MMVF21 štúdia). Potkany boli preskúmané raz denne na klinické príznaky, chorobnosť a úmrtnosť. Podrobné klinické pozorovania boli raz týždenne počas počiatočnej karantény a aklimatizácie, dvakrát za deň po podaní, raz denne v priebehu prvých 2 týždňov a potom bezprostredne pred zabitím zvierat. Potkany boli vážené v prvý deň podania, raz týždenne po ňom až do 13.-ho týždňa a raz za mesiac potom.

Ak mezotelióm metastázuje rýchlo cez peritoneálnu dutinu, brušná vodnatelnosť je často prvým zistiteľným symptómom. Všetky zvieratá vykazujúce príznaky bolesti brucha boli zabité inhalovaním CO₂. V MMVF21 štúdiu boli zvieratá zabité len v krajných prípadoch. Podrobné pitevné vyšetrenia boli vykonané u všetkých zvierat. Pitva zahŕňala podrobné

vyšetrenia peritoneálnych orgánov a hrudnej dutiny. Zo všetkých zvierat boli odobraté vzorky tkaniva na histológiu: napr. segmenty čreva, pečene, sleziny, pankreasu. Tkanivá boli odstránené a uložené vo formalíne. Výsledky štúdie boli posudzované z hľadiska možných nežiadúcich účinkov a vykonala sa pitva na zistenie hispatologických nálezov. Hodnotenie zahŕňa výskyt nádorov, analýzu prežitia a porovnanie telesnej váhy. Vo výsledkoch štúdie neboli žiadne náznaky, že ip injekcia HT vlákien má nejaký vplyv na zdravie, na prežitie a na zmenu telesnej hmotnosti v porovnaní s kontrolnou skupinou. Prežitie zvierat v skupinách MMVF21 bolo výrazne nižšie a došlo k zníženiu rastu zvierat v porovnaní s kontrolnou skupinou. Neexistuje žiadny zjavný rozdiel v prežití medzi dvoma kontrolnými skupinami. Po pitve boli pozorované početné makroskopické uzliny v peritoneálnej dutine vo väčšine (88 %) vystavených zvierat v MMVF21 skupinách a ďalšie, menšie uzliny, boli nájdené v orgánoch spojených s bruchom pri mikroskopickom vyšetrení. Zistilo sa, že tieto zhluky vlákien sú uchytené buď na povrchu vnútorností alebo voľne v brušnej dutine. Po pitevnom skúmaní zvierat vystavených HT a zvierat v kontrolných skupinách bol nájdený nízky výskyt makroskopických uzlín (tri zvieratá a jedno zviera, v uvedenom poradí).

U MMVF21 sa vytvárali slučky na tenkom čreve, dochádzalo k zrastu tkaniva medzi žalúdkom a ostatnými orgánmi a medzi tukovými tkanivami a inými orgánmi. Vyskytli sa tri typy nádorov u exponovaných zvierat. Nádory, ktoré sa vyskytli v kontrolných skupinách boli benígny (nezhubný) nádor, adenóm hypofýzy (42 - 54 %) a prsný adenokarcinóm (40 - 46 %). Ide ale o veľmi časté nádory v tomto kmeni potkanov a zistenia nie sú neočakávané. U zvierat exponovaných MMVF21 bol najčastejším nádorom mezotelióm (56 %). Tento nádor nebol nájdený v žiadnej inej skupine (kontrolnej ani HT), preto je to veľmi významný nález. Omnoho nižší výskyt nádorov prsných a hypofýzy bol nájdený u zvierat exponovaných MMVF21 v porovnaní s kontrolnými skupinami. To bolo v dôsledku vzniku mezoteliómu, ktorý pôsobí ako konkurenčná príčina smrti.

Je potrebné si uvedomiť, že potenciálna patogenita daného typu vlákna je predovšetkým závislá na rozsahu, v akom sú vlákna vdychované a pretrvávajú v pľúcach. HT ukázalo minimálne uloženie kolagénu, podobné tomu, ktoré sa dalo očakávať pre akýkoľvek biologicky inertný prach na tejto úrovni expozície, zatiaľ čo MMVF21 má za následok fibrózy.

Iné štúdie [57] našli výrazné rozdiely vo fyziológii alveolárnych a peritoneálnych makrofágov vo svojej odpovedi na zápalové podnety a minerálne vlákna, ale mechanizmy pozorujúce rozdiely v bioperzistencii v peritoneálnej dutine a pľúcach nie sú v súčasnosti

známe. Za dôležitý mechanizmus pre odstránenie HT vlákien z pľúc je považované vnútrobunkové a extracelulárne trávenie a rozklad vlákien pľúcnymi makrofágmi.

Rozdiely v bioperzistencii vlákien medzi pľúcami a peritoneálnou dutinou spochybňujú oprávnenosť ip injekcie na zhodnotenie potenciálneho rizika u MMVFs. Avšak, výsledky tejto štúdie poukazujú na dôležitosť vyššej biorozpustnosti HT vlákien v porovnaní s MMVF21, pretože výsledky porovnávacej štúdie vykázali výrazný rozdiel v ip patogenite z MMVF21 a HT z hľadiska ich karcinogénneho potenciálu.

2.4.3.3 Posúdenie rizika pri expozícii sklenou vatou

Sklená vata dnes na mnohých miestach nahrádza azbest, ktorý sa niekedy používal ako izolačný materiál. Je preto potrebné porovnať ich karcinogénny potenciál. Vzhľadom k tomu, že tri hlavné druhy azbestových vlákien (chryzotil, amozit, krokydolit) spôsobujú rakovinu pľúc pri vysokých expozíciách, je obecné rozšírené presvedčenie, že všetky vlákna sú karcinogénne po vdýchnutí v dost' veľkých dávkach.

Ani epidemiologické štúdie expozície človekom, ani štúdie na zvieratách neukázali nebezpečné účinky sklenej vaty. Ale v tomto prípade, rovnako ako v mnohých iných situáciách, kde existuje potenciálne riziko, spoločnosť si želá ďalšie ubezpečenia. Existujú dobré odhady rizika spojeného s expozíciou chryzotilového azbestu pri vysokých expozíciách a dávkach. V tejto štúdii [48] sa porovnávalo, o koľko je menšie riziko expozície sklenou vatou.

Záver je, že vlákna sklenej vaty sú päť až desaťkrát menej rizikové ako azbest (a riziko môže byť aj nulové). Pre montérov izolácie sklenej vaty, ktorí nosia respirátory, je riziko rakoviny asi 6 z milióna za rok (a môže byť aj nulové). Teda, z 10 000 montérov by mohol ochorieť jeden za 16 rokov. Nízke riziko je v súlade s tým, že nikto nemá nájdenú rakovinu vzniknutú z výroby a inštalácie sklenej vaty aj napriek horlivému vyhľadávaniu. To je porovnané s niekoľkými ďalšími pracovnými rizikami. Bežná opatrnosť ale naznačuje, že akákoľvek inštalácia sklenej vaty vyžaduje nosiť respirátor.

2.4.3.4 Rýchlosť rozpúšťania sklo-keramických vlákien v simulovanej pľúcnej tekutine

Hlavným cieľom tejto štúdie bolo určenie rýchlosti rozpúšťania sklo-keramických vláknitých materiálov pomocou in-vitro testov. Testované boli tri typy vlákien líšiac sa zložením (tab. 5).

Tab. 5: Chemické zloženie hlavných zložiek testovaných vlákien v hmotnostných percentách [51].

	VL 1 [hm %]	VL 2 [hm %]	VL 3 [hm %]
SiO ₂	62,9	49,79	4,19
Al ₂ O ₃	0,25	46,54	95,61
CaO	30,73	0,12	0,02

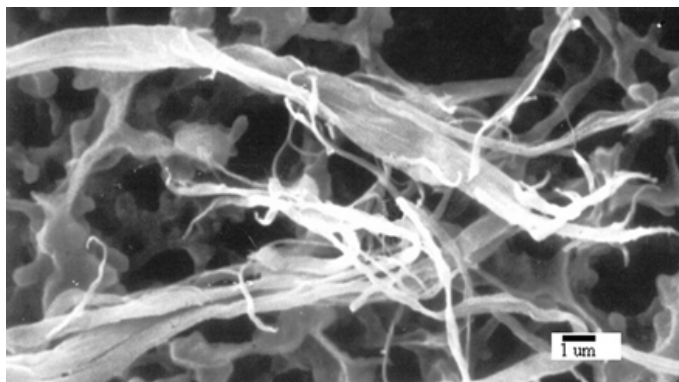
Testované materiály boli podrobené statickým testom, vlákno VL 1 i testom prietokovým. Ako korózne médium boli pripravené simulované pľúcne tekutiny, simulujúce extracelulárne prostredie v pľúcach (pH 7,4) a prostredie vo vnútri makrofágov (pH 4,5). Statické testy na sledovaných materiáloch prebiehali v biologickom termostate pri teplote $37,0 \pm 0,5$ °C. Prietokové testy boli prevedené pri prietokovej rýchlosti $F = 60$ ml/deň a ďalej porovnané s testami prevedenými pri rýchlosti prietoku $F = 135$ ml/deň. Z nameraných výsledkov bola určená normalizovaná rýchlosť rozpúšťania sledovaných materiálov [g/m^2].

Ako statické tak aj dynamické testy potvrdili, že v simulovanej extracelulárnej pľúcnej tekutine s hodnotou pH 7,4 dochádza k rýchlejšiemu rozpúšťaniu sledovaných materiálov, než v prostredí simulujúcom intracelulárne prostredie s hodnotou pH 4,5. Za dynamických podmienok rýchlosť rozpúšťania rastie so zvyšujúcou sa rýchlosťou prietoku. Riadiacim dejom rozpúšťania sledovaného materiálu je ustálená difúzia produktu povrchovej reakcie nehybnou vrstvou roztoku [51].

2.4.4 Testovanie nebezpečnosti p-aramidových vlákien

Para-aramidové vlákna rovnako ako vlákna sklenené nepatria k nanovláknenným materiálom a majú rozmery, ktoré sú považované za nevdychnuteľné. Priemery p-aramidových vlákien sa pohybujú v rozmedzí 12 - 15 μm . Ale napr. pri trení môžu byť

produkované ich fibrily (tj. p-aramidové RFP – respirable-sized fiber-shaped particulate) s rozmermi 300 – 700 nm a dĺžkou až do 100 μm (obr. 11). A tým vzniká riziko prieniku týchto fibríl do dýchacieho systému človeka. Nasledujúca časť je venovaná p-aramidovým RFP a posúdeniu ich rizikovosti v štúdiách *in vitro* a *in vivo*.



Obr. 11: Snímok p-aramidových vlákien a napojených RFP vlákien z elektrónového mikroskopu; zväčšenie 3500x [54].

V *in vivo* a *in vitro* štúdiách [54] bolo už predtým vyhodnotené, že para-aramidové vdýchnuteľné častice v tvare vlákna (RFP) sú biologicky rozložiteľné v pľúcach a pľúcnych bunkách potkanov po expozíciách.

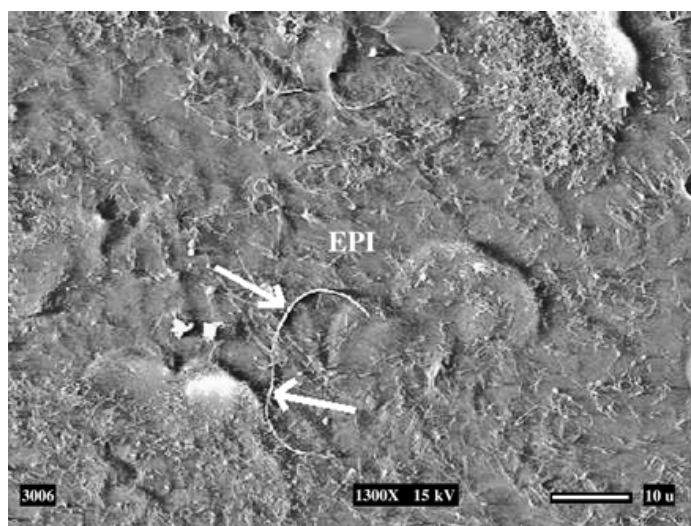
Cieľom *in vitro* štúdie [45] bola inkubácia ľudských pľúcnych epitelových buniek A549 a primárnych alveolárnych makrofágov (HBAL) s p-aramidovými RFP počas 1 hodiny, 1 dňa a 1 týždňa k posúdeniu skrátenia RFP. Bolo by nevhodné vystaviť človeka priamo p-aramidovým RFP aerosólom. Vzhľadom k tomu, že existuje vzťah medzi *in vivo* a *in vitro* štúdiami u potkanov, predpokladá sa, že *in vitro* štúdie s ľudskými bunkami poskytnú ďalšie potvrdenie o pravdepodobnosti *in vivo* biologickej odbúrateľnosti vlákien RFP u človeka.

Vzorky p-aramidových RFP vlákien boli získané od firmy DuPont a pripravené ako vdýchnuteľné aerosóly. Priemerné dĺžky RFP boli 16,8 μm a priemery 0,4 μm . Boli vedené tri typy štúdia k posúdeniu mechanizmov biologickej odbúrateľnosti: (1) ľudské primárne alveolárne makrofágy HBAL, (2) bunková kultúra ľudských pľúcnych epitelových buniek A549, (3) kultúry ľudských pľúcnych epitelových buniek a alveolárnych makrofágov.

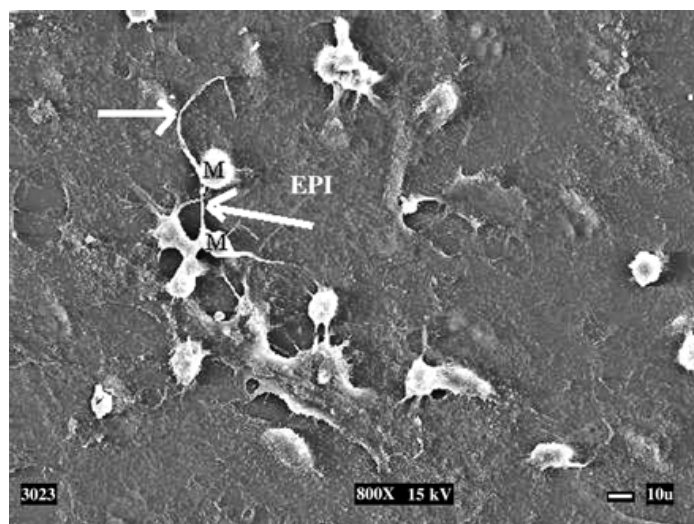
Metóda použitá na získanie ľudských alveolárnych makrofágov bola už predtým opísaná [74]. Stručne povedané, dobrovoľníci boli prijatí prostredníctvom poštových letákov alebo sa prihlásili na základe inzerátu v novinách. Dobrovoľníci museli mať vek medzi 18 až 40, nesmeli mať žiadnu alergiu alebo respiračné ochorenie, museli to byť nefajčiari najmenej

5 rokov a nesmeli mať v tej dobe predpísané žiadne lieky, s výnimkou antikoncepcie. Subjekty boli vyšetrené. Vzala sa im vzorka krvi a urobil sa krvný obraz. U žien bol spravený tehotenský test a ak bol pozitívny, žena bola vylúčená z výskumu. Pred účasťou v štúdiu boli všetci riadne informovaní o postupoch a potenciálnych rizikách a každý podpísal vyhlásenie so súhlasom. Žiadne narkotiká alebo sedatíva neboli pri testoch použité. Dobrovoľníci potom podstúpili bronchoalveolárny výplach (výplach dýchacích ciest).

Ľudské pľúcne epitelové bunky A549 boli zakúpené od American Type Culture Collection a pestované v F-12K (Kaighnova modifikácia Hamsovej F-12, 10 % FBS (fetálne bovínne sérum) + Pen-Strep roztok) pri teplote 37 °C a 5 % CO₂. Potom bolo asi 570 000 A549 buniek daných do plastových diskov, ktoré obsahovali 10 x 35 mm veľké Petriho misky. Bunky boli inkubované po dobu štyroch dní, to umožnilo vznik jednoduchých vrstiev na diskoch. Na štvrtý deň bolo 500 µl štandardizovaného prípravku p-aramidu pridaných do kultúry buď na 1 hodinu, 1 deň alebo 1 týždeň. Na konci inkubačnej doby boli bunky fixované Karnovského roztokom a buď prešli SEM hodnotením alebo tkanivovou tráviacou procedúrou s 1,25 % roztokom chlórnanu (tj. 25 % bielidlo Clorox) pri 60 °C po dobu 9 min. Tkanivová tráviaca metóda pre 9 min selektívne vylúhuje bunky, ale nie p-aramidové RFP vlákna, ktoré sa ďalej filtrujú a spracujú na rastrovom elektrónovom mikroskope na hodnotenie dĺžky. Minimálne 100 RFP vlákien bolo zmeraných a zaznamenaných v každej skupine po post-expozičnej dobe a boli urobené digitálne mikrografy (obr. 12, 13).



Obr. 12: Rastrovací elektrónový mikrograf ľudskej A549 pľúcnej epitelovej bunkovej kultúry (EPI) exponovanej p-aramidovým RFP vláknom (šípky) po jednom dni in vitro expozície; zväčšenie 1300x [54].



Obr. 13: Rastrovací elektrónový mikrogram ľudskej A549 pľúcnej epitelovej bunkovej kultúry (EPI) a alveolárneho makrofágu (M), p-aramidové RFP vlákno (šípky) po jednom dni inkubácie; zväčšenie 800x [54].

Údaje z in vitro štúdie s ľudskými epitelovými bunkami A549 (2) a p-aramidovými vláknami RFP ukázali, že po 1 h neexistujú rozdiely v strednej dĺžke RFP medzi skupinami.

Po jednom dni a jednom týždni post-inkubácie, priemerná dĺžka p-aramidových RFP v štúdiu s ľudskými epitelovými bunkami (2) bola výrazne vyššia ako v štúdiu s makrofágmi a epitelovými bunkami (3), ale HBAL bunková kultúra (1) a štúdia s makrofágmi a epitelovými bunkami (3) boli na nerozoznanie od seba. Tento výsledok ale nie je prekvapujúci, pretože sa zdá, že alveolárne makrofágy sú pravdepodobne zodpovedné za skrátenie p-aramidových RFP. Tieto výsledky podporujú hypotézu, že komponenty ľudských pľúcnych buniek a tekutiny uľahčujú biologickú odbúrateľnosť p-aramidových RFP. Údaje z in vitro štúdie s použitím "dvojnásobnej dávky" ukázali, že ak sa zdvojnásobí dávka ľudských makrofágov, urýchlí sa skracovanie p-aramidových RFP.

Po šiestich mesiacoch post-expozičnej doby bol nameraný rapídny pokles priemernej dĺžky RFP z 12,5 µm (bezprostredne po expozícii) až na 7,5 µm a mierny pokles priemeru z 0,4 µm na 0,2 µm. Percento RFP vlákien dlhších než 15 µm sa znížilo z 30 % ihneď po expozícii na 5 % po 6 mesiacoch, percento p-aramidových RFP s dĺžkou 4 - 7 µm bolo zvýšené z 25 na 55 % v rovnakom období [45].

V štúdiu in vivo [46] boli potkany vystavené aerosólom z troch rôznych typov vlákien: (1) p-aramidovým RFP, (2) vláknam chryzotilového azbestu a (3) skleneným vláknami 100/475 a posúdili sa relatívne bioperzistenčné vlastnosti po desiatich dňoch inhalačnej

expozície pri koncentráciách 700 vlákien/ml. Najvýznamnejšie zníženie záťaže pľúc vláknami boli namerané prvé tri mesiace po expozícii, ale závisí to na každom type vlákna. Napríklad, inhalácia p-aramidových RFP mala za následok rýchle odbavenie najdlhších vlákien RFP počas prvého mesiaca post-expozície a to bolo spojené s počiatočným zvýšením počtu kratších RFP. U sklenených vlákien hodnoty tiež ukazujú rýchle odbavenie dlhších vlákien v kombinácii so zvýšením v počte veľmi krátkych vlákien, v súlade s odstránením dlhých vlákien pomocou rozpadu. V kontraste, u chryzotilového azbestu boli najprv odstránené krátke vlákna. Avšak, dlhé chryzotilové vlákna boli uchované na dlhšiu alebo dobu neurčitú v pľúcach. Preto dospel autor k záveru, že bioperzistencia dlhých vlákien (dlhšie než 15 μm) chryzotilového azbestu bola podstatne vyššia, ako je u dlhých p-aramidových RFP vlákien alebo sklenených vlákien. Počas rozpadu každého druhu vlákna závisí na veľkosti frakcie a časovom intervale skúmania.

Na rozdiel od väčšiny iných organických typov vlákien, RFP boli extenzívne testované na pľúcnu toxicitu. V tomto ohľade, výsledky štúdií toxicity [45, 47] po vdýchnutí potkanmi a škrečkami v niekoľkých rozličných laboratóriách na celom svete stále dokazujú, že po počiatočnom nahromadení vdychovaných RFP v pľúcach je rýchle odbavenie najdlhších fibríl súbežné s počiatočným nárastom počtu kratších fibríl. Počas rozpadu každého druhu vlákna závisí na veľkosti frakcie a časovom intervale skúmania.

P-aramidové vlákna napr. vo forme drte obsahujú RFP ako svoju neoddeliteľnú súčasť [73]. Drť sa používa komerčne v tesneniach a výrobkoch, akými sú napr. brzdové obloženia a tak môžu prichádzať do kontaktu s ľuďmi. Štúdie in vitro a in vivo majú pomôcť pri skúmaní ich možných rizík.

V rešeršnej časti tejto diplomovej práce nie sú zďaleka uvedené všetky možnosti testovania a zdravotných rizík, ktoré sú popisované. Článkov je v dnešnej dobe už obrovské množstvo, ale len minimum z nich sa venuje konkrétne zdravotným rizikám nanovláken. Časť publikácií sa dotýka problematiky nebezpečnosti uhlíkových nanotúb a len zanedbateľné množstvo skúma zdravotné riziká elektrostaticky zvláknených nanovláken. Ďalším dôvodom je, že ešte stále neexistuje jednotná norma, ako vlastne nanočastice a nanovlákná testovať, čo sa ich zdravotných rizík týka.

Nie je možné vypísať sem jednoznačné závery, ale je potrebné povedať, že testovanie zdravotných rizík je nutné a je to téma, ktorá je aktuálna a zaslúži si veľkú pozornosť.

3 Experimentálna časť

Experimentálna časť diplomovej práce popisuje materiály a metódy, ktoré boli v tejto časti použité pri testovaní vzoriek v simulovanej pľúcnej tekutine a pri hodnotení oddeľovania vlákien z nanovláknenných vrstiev. Experimenty sú v tejto práci volené s ohľadom na ich čo možno najjednoduchšie prevedenie pri poskytnutí aspoň orientačných hodnôt ukazujúcich na bezpečnosť či nebezpečnosť práce s elektrostaticky zvláknenými materiálmi. Nanomateriály zahŕňajú i elektrostaticky zvláknené nanovlákná. O ich zdravotných rizikách zatiaľ neexistujú jednoznačné dôkladné štúdie a s ohľadom na variabilitu procesu výroby a prípravy roztokov pre výrobu ich ani nie je ľahké vyhľadať. Preto bolo potrebné pokúsiť sa nájsť jednoduchý úvodný test, ktorý by poskytol informácie o chovaní elektrostaticky zvláknených materiálov (a nielen nanovláknenných, ako je zrejmé z tab. 6 – použité materiály) po ich vniknutí do organizmu najjednoduchšou cestou, ako je popisované v teoretickej časti a to teda dýchacím systémom do pľúc. Tento úvodný test je popisovaný v práci ako Experiment 1.

Na prvý pohľad sa môže zdať nelogické zaradenie experimentov venujúcich pozornosť možnosti oddeľovania jednotlivých vlákien či nanovláken, resp. ich krátkych úsekov z elektrostaticky zvlákneného materiálu až na druhé miesto. Ale je nutné poznamenať, že takéto štúdie zatiaľ neboli nikde v dostupnej literatúre nájdené. Teda skúšky popisované v Experimente 2 sú len prvotnými testmi a majú skôr informatívny charakter a ich hodnota je nižšia. Z tohoto dôvodu sú tieto testy zaradené až na druhé miesto, aj keď logicky musí najprv dôjsť k oddeleniu vlákna, nanovlákná, či jeho časti. Následne môže tento objekt vniknúť do dýhacieho ústrojenstva a postupovať ďalej do ľudského organizmu a až potom vzniká to popisované nebezpečenstvo.

Záverom je potrebné povedať, že autorka sa sústredila na tieto dve oblasti testovania pre ich jednoduchosť a možnosť testovať in vitro bez špeciálnych podmienok.

3.1 Použité materiály

Nanovláknenné materiály použité pri experimentech sú uvedené v tab. 6. Všetky materiály boli zvlákňované z roztoku na zariadení Nanospider, ktoré je k dispozícii na Technickej univerzite v Liberci, v poloprovoze Katedry netkaných textílií. U materiálov bola zistená plošná hmotnosť a stredná hodnota priemeru vlákien získaná zo 100 meraní vlákien zo snímok zo skenovacieho elektrónového mikroskopu. Graf č. 2 ukazuje stredné hodnoty priemerov vlákien použitých materiálov.

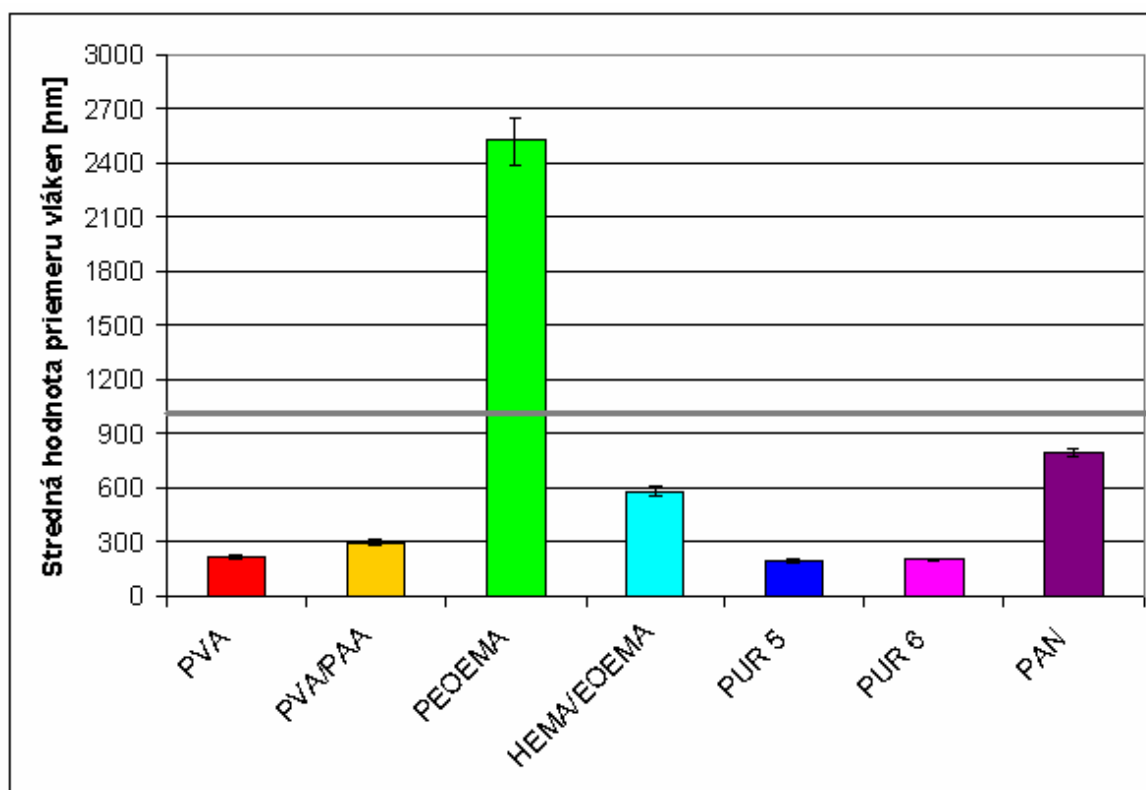
Cieľom tejto diplomovej práce nebolo materiály pre testovanie vyrobiť, ale otestovať práve tie, ktoré sa bežne vyrábajú a používajú pri rôznych experimentoch na Katedre netkaných textílií a ktorých tiež bolo k dispozícii dostatočné množstvo na vykonanie úvodných testov.

Tab. 6: Elektrostaticky zvláknené materiály použité pri experimentoch.

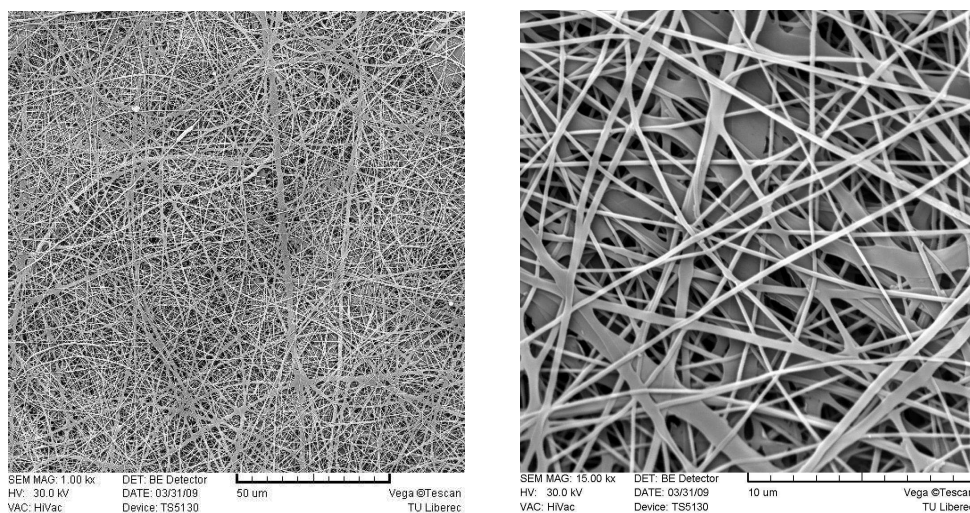
	Použité materiály	Plošná hmotnosť [g/m ²]	Stredná hodnota priemeru vlákien [nm]	Rozpúšťadlo pre výrobu roztoku pre elektrostatické zvlákňovanie
1	PVA	2,42	213 ± 11	voda
2	PVA/PAA	12,97	291 ± 15	voda
3	PEOEMA	94,39	2520 ± 130	ethanol/acetón 9:1
4	HEMA/EOEMA	5,4	580 ± 30	etanol/voda 66:3
5	PUR 5	2,11	195 ± 11	dimetylacetamid
6	PUR 6	5,44	204 ± 7	dimetylacetamid
7	PAN	6,22	798 ± 20	dimetylformamid

PVA	polyvinylalkohol zosieťovaný s použitím glyoxalu a kyseliny fosforečnej
PVA/PAA	polyvinylalkohol zosieťovaný s použitím kyseliny akrylovej
PEOEMA	poly(2-etoxyetylmetakrylát)
HEMA/EOEMA	kopolymér poly(2-hydroxyetylmetakrylátu) a 2-etoxyetylmetakrylátu
PUR 5	polyuretán 5
PUR 6	polyuretán 6
PAN	polyakrylonitril

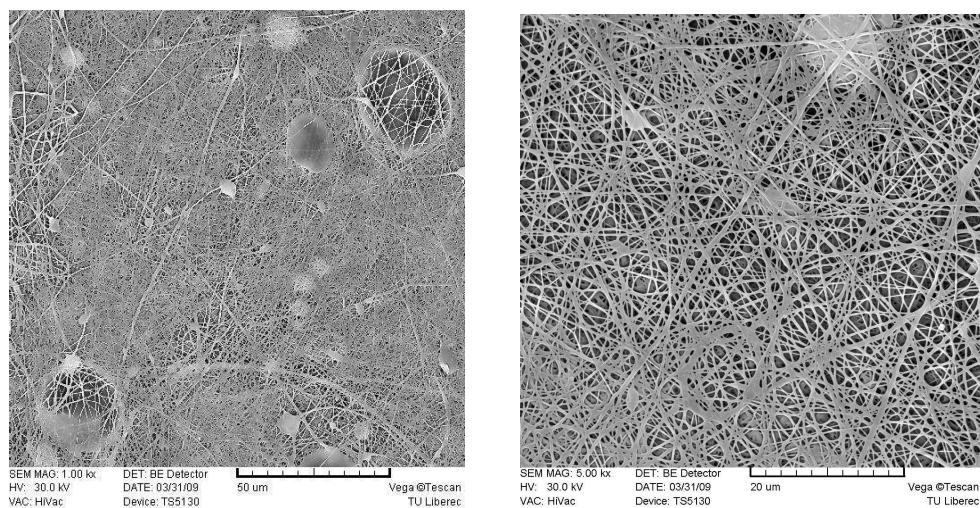
Graf č. 2: Stredné hodnoty priemerov vlákien použitých vzoriek. Sivá čiara označuje hranicu 1000 nm.



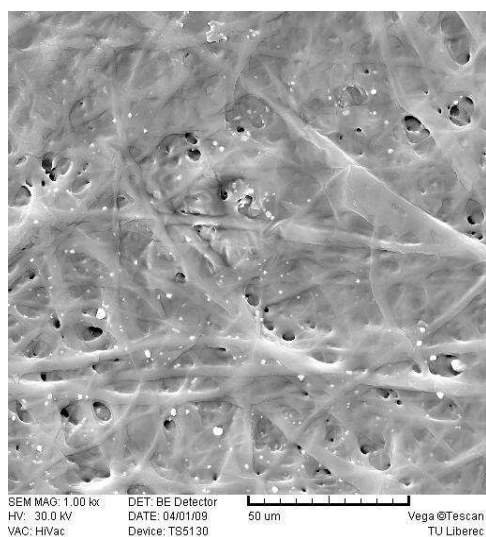
Pomocou SEM - skenovacieho elektrónového mikroskopu (vid'. kapitola 3.2) boli vytvorené snímky použitých materiálov (obr. 14 – 20). Všetky snímky sú uvedené v prílohe A. Na vyššie uvedené určenie stredných hodnôt priemerov vlákien bol použitý softwar LUCIA G (vid'. kapitola 3.2).



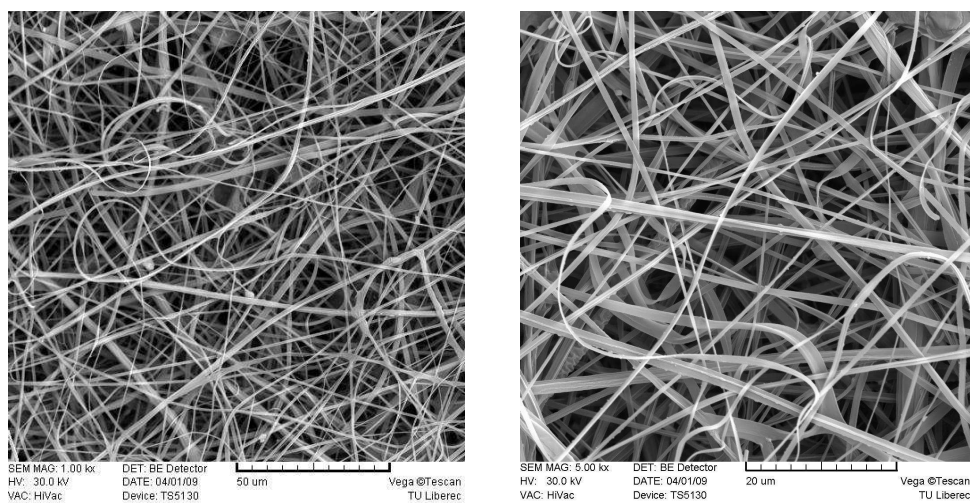
Obr. 14: Snímky PVA zo skenovacieho elektrónového mikroskopu.



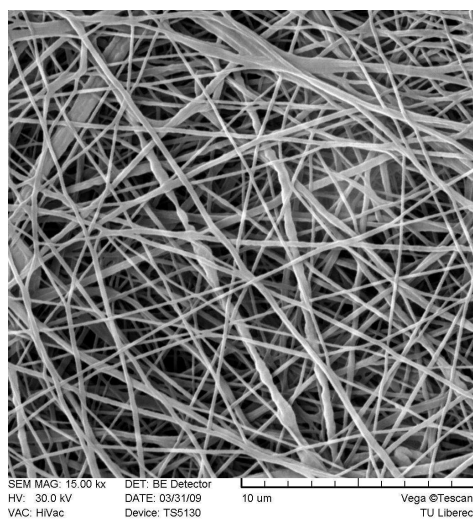
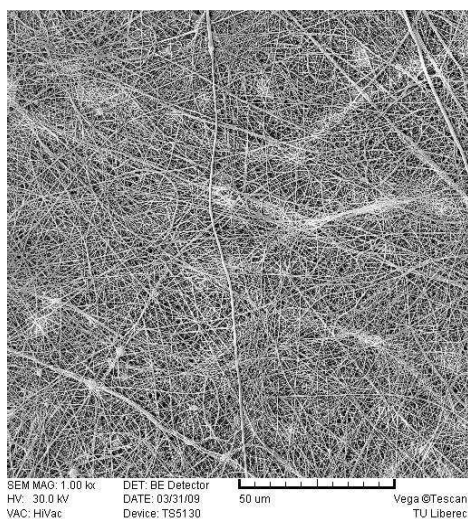
Obr. 15: Snímky PVA/PAA zo skenovacieho elektrónového mikroskopu.



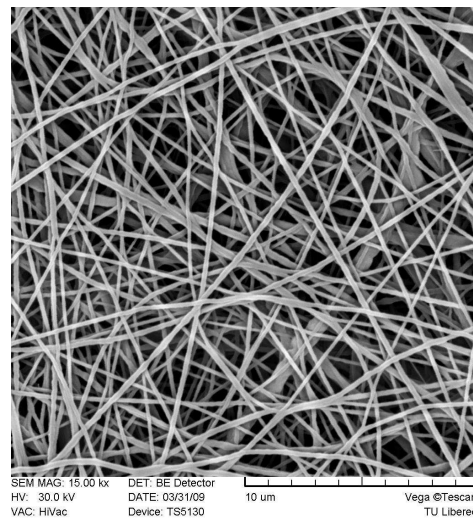
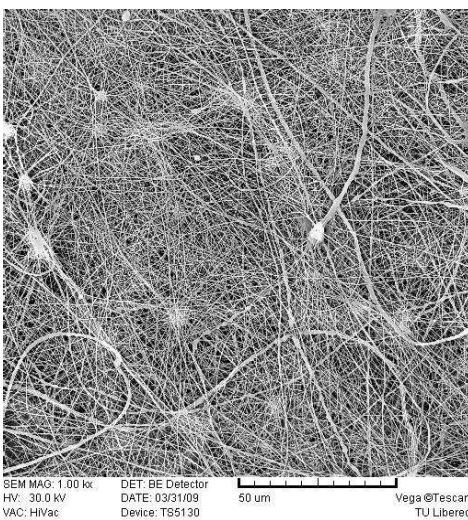
Obr. 16: Snímok PEOEMA zo skenovacieho elektrónového mikroskopu.



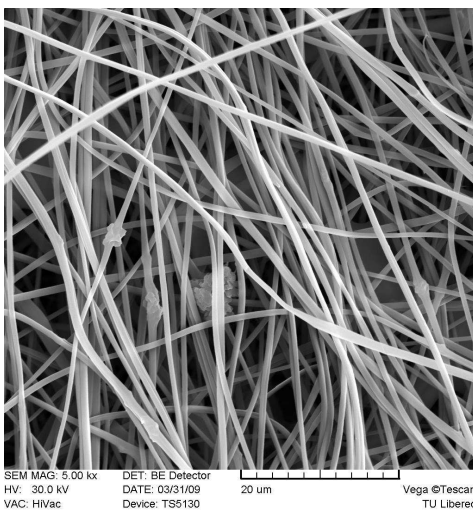
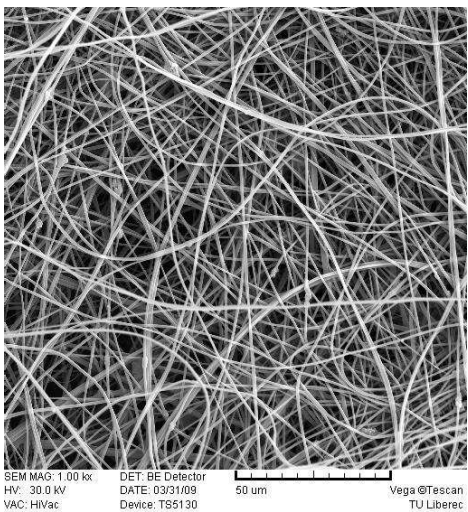
Obr. 17: Snímky HEMA/EOEMA zo skenovacieho elektrónového mikroskopu.



Obr. 18: Snímky PUR 5 zo skenovacieho elektrónového mikroskopu.



Obr. 19: Snímky PUR 6 zo skenovacieho elektrónového mikroskopu.



Obr. 20: Snímky PAN zo skenovacieho elektrónového mikroskopu.

3.2 Použité zariadenia

SEM - skenovací elektrónový mikroskop

Skenovací elektrónový mikroskop (SEM) vytvára obraz povrchov materiálov s vysokým rozlíšením. K zobrazovaniu využíva pohyblivý paprsok elektrónov. Ako putuje paprsok po vzorke, mení sa podľa charakteru povrchu úroveň signálu v detektore. Z týchto signálov je potom zostavený výsledný obraz. Výhody SEM: veľká hĺbka ostrosti, „plastické“ zobrazenie, veľká rozlišovacia schopnosť. Zväčšenie 12 – 250 000x. Príprava preparátu spočíva v pripevnení skúmanej vzorky na pracovný stôl a vzorka sa pokryje tenkou vrstvou zlata (10 – 30 nm) kvôli vodivosti povrchu vzoriek izolantov [24].

Softwarový systém LUCIA G

LUCIA G je softwarový systém pre analýzu obrazu, ktorý umožňuje komunikáciu medzi snímacím zariadením (kamerou), snímacou kartou a počítačom. Výstupnou informáciou je obraz – mikrofotografia, pripravená k ďalšiemu spracovaniu buď v software LUCIA, alebo v iných softwaroch. Spracovaním sa získajú farebné a digitálne informácie o skúmaných objektoch. LUCIA používa pre uchovanie obrazovej informácie svoj vlastný formát tzv. LIM, alebo sa dá priamo v LUCIA ukladať do štandardných obrazových formátov ako napr. JPG, BMP, TIF, RLE. Okrem iného sa dá systém LUCIA použiť napr. na zisťovanie strednej hodnoty priemeru vlákien zo snímok získaných i pomocou iného zariadenia než je popisovaný softwar [23].

Nu-Martindale 864

Zariadenie Martindale (obr. 21) je skúšobné zariadenie, ktoré ponúka spoľahlivú a bežnú metódu určovania odolnosti plošných textílií v klasickom zmysle slova (teda hlavne tkanín a pletenín) proti oderu a žmolkovaniu. Je usporiadané pre jednoduchú obsluhu a nenáročnú prevádzku, bez nutnosti stáleho dohľadu obsluhy. Konštrukcia zariadenia umožňuje jeho umiestnenie na stôl s napájaním z elektrickej siete 230V a 50Hz. Skúmaná textília sa odiera o normovanú vlnársku tkaninu.

Zariadenie konštruované v osemdržiakovom prevedení, ktoré umožňuje skúšky na viacerých vzorkách súčasne. Hlavným konštrukčným prvkom prístroja je základná doska, na ktorú sú umiestnené odieracie stoly a mechanizmus pohonu. Tento mechanizmus zaisťuje,

že unášač držiakov vzoriek textílií sleduje požadovaný Lissajousov obrazec. Prístroj je vybavený digitálnym nastaviteľným počítadlom, ktoré zaznamenáva otáčky a automaticky zastaví vodiacu dosku s držiakmi vzoriek textílií po odpočítaní nastaveného počtu otáčok. Súčasne má počítadlo schopnosť v prípade výpadku elektrickej energie zachovať napočítané hodnoty a po zapnutí elektrickej energie pokračovať v skúške tam, kde bola prerušená [4].

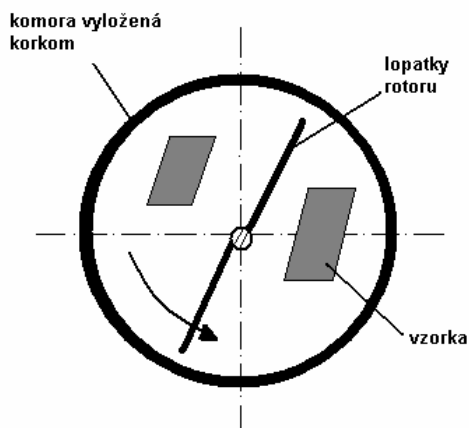


Obr. 21: Zariadenie Nu-Martindale 864.

Komorový žmolkovací prístroj

Tento prístroj stanovuje skúšobnú metódu pre zisťovanie odolnosti všetkých plošných textílií proti žmolkovaniu a rozvlákneniu. Žmolkovací prístroj (obr. 22) pozostáva zo skúšobných komôr, priemer komory je 146 mm a hĺbka 120 mm. Počet otáčok za minútu je 1200. Korková doska má hrúbku 1,5 – 2,5 mm.

Podstatou skúšky je, že sa skúšobné vzorky pohybujú pomocou lopatiek v komore vyloženej korkom, pričom sa povrch vzoriek otiera o steny komory. Po stanovených časových intervaloch sa hodnotí vzhľad vzoriek.



Obr.22: Komorový žmolkovací prístroj (vpravo), princíp zisťovania žmolkovitosti (vľavo) [40].

Obe tieto vyššie uvedené zariadenia sa bežne využívajú pre klasické textilné materiály. Je zrejmé, že ich využitie pre testy nanovlákných elektrostaticky zvlákných materiálov nebude optimálne, ale je potrebné vyskúšať aj tieto možnosti a nájsť úskalia, ktoré ich využitie pre testovanie elektrostaticky zvlákných vrstiev prináša, pretože dosiaľ nebolo takéto testovanie publikované.

3.3 Experiment 1 - Testovanie nanovlákných materiálov v simulovanej pľúcnej tekutine

Ak dôjde k oddeleniu nanovlákn či jeho časti z objemu vrstvy a k prieniku takýchto materiálov do ľudského tela, môže nastať, ako je už popisované v teoretickej časti, až vznik nádorových ochorení či zápalov. Ako však vylúčiť, že vyrobené nanovlákné materiály nespôsobia takéto krajné riešenia? Jedným z fyziologických mechanizmov odbúravania cudzorodých látok došlých až do pľúc je pľúcna tekutina, ktorej úlohou je takéto materiály rozpustiť. Ak teda pľúcna tekutina materiál rozpustí, je riziko závažných ochorení, jednoducho povedané, zažehnané. Preto bola pre testovanie vyššie uvedených elektrostaticky zvlákných materiálov použitá najjednoduchšia z metód popisovaných v literatúre a to modifikovaná statická metóda *in vitro*, spomenutá v teoretickej časti v kapitole 2.4 a použitá v experimentoch v kapitole 2.4.1 [10, 20].

Vzorky testovaných materiálov boli najprv vložené do exikátoru s relatívnou vzdušnou vlhkosťou RH 68 %. Tej sa dosiahlo tak, že sa exikátor naplnil nasýteným roztokom CaCl_2 , uzavrel sa a vlhkomerom sa odmerala vzdušná vlhkosť vo vnútri exikátoru. Dôležitá nie je hodnota vzdušnej vlhkosti, ale to, že bola počas celého experimentu používaná rovnaká. Potom boli vzorky zvážené a vložené do baniek (so zabruseným uzáverom) so simulovanou pľúcnou tekutinou (SLF). Jej zloženie je uvedené v prílohe B. Od každého materiálu boli použité 3 vzorky, ich hmotnosti sa pohybovali v rozmedzí od 0,05 – 0,07 g, aby boli dobre porovnateľné. Potom sa vzorky v bankách so simulovanou pľúcnou tekutinou vložili do inkubátoru (obr. 23) s udržiavanou teplotou 37 °C. V týchto podmienkach boli ponechané 7 dní, rovnako, ako popisuje publikácia [20]. Po uplynutí tejto doby sa vzorky niekoľkokrát prepláchli destilovanou vodou, aby sa z nich vymyla simulovaná pľúcna tekutina a prefiltrovali sa cez filtračný papier, ktorého hmotnosť pri RH 68 % už bola známa. Následne

boli vzorky sušené v sušiarňi pri 100 °C 2 hodiny. Po vysušení sa aj s filtračným papierom vložili znovu do exikátoru s RH 68 % a zvažili sa. Filtračný papier sa odčítal a tým sa získal úbytok hmotnosti testovaných vzoriek pri stále rovnakej vzdušnej vlhkosti 68 %. Dôvodom bolo, že ak by sa počas experimentu menila vzdušná vlhkosť v miestnosti, tak by sa mohla meniť aj váha vzoriek a filtračných papierov. V exikátore sa vzorky a filtračné papiere nechali pred vážením minimálne 3 hodiny, aby došlo k vyrovnaní vlhkostí vzoriek a filtračných papierov s okolitým prostredím. V tab. 7 sú uvedené váhové úbytky vzoriek v percentách a stredné hodnoty úbytkov vzoriek v percentách po 7-ich dňoch v pľúcnej tekutine, teda po ich odfiltrovaní a vysušení. Graf č. 3 ukazuje stredné hodnoty úbytkov vlákien použitých vzoriek v percentách.

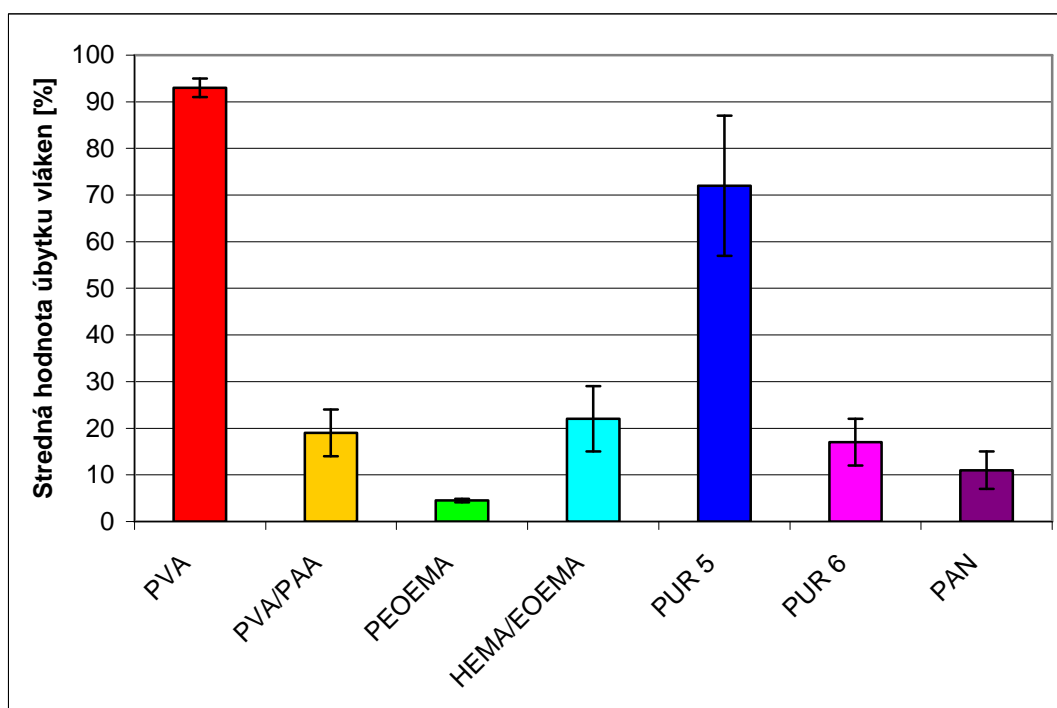


Obr. 23: Inkubátor použitý pri experimente.

Tab. 7: Váhové úbytky vzoriek a stredné hodnoty úbytkov vzoriek v percentách po 7.-ich dňoch v simulovanej pľúcnej tekutine - po odfiltrovaní a vysušení.

	Váhový úbytok vzoriek [%]	Stredná hodnota úbytku vzorky [%]
PVA (1)	95	93 ± 2
PVA (2)	93	
PVA (3)	90	
PVA/PAA (1)	22	19 ± 5
PVA/PAA (2)	15	
PVA/PAA (3)	24	
PEOEMA (1)	5	4,5 ± 0,4
PEOEMA (2)	4	
PEOEMA (3)	5	
HEMA/EOEMA (1)	29	22 ± 7
HEMA/EOEMA (2)	18	
HEMA/EOEMA (3)	16	
PUR 5 (1)	87	72 ± 15
PUR 5 (2)	72	
PUR 5 (3)	57	
PUR 6 (1)	12	17 ± 5
PUR 6 (2)	23	
PUR 6 (3)	15	
PAN (1)	12	11 ± 4
PAN (2)	7	
PAN (3)	15	

Graf č. 3: Stredné hodnoty úbytkov vlákien použitých vzoriek.



Počas experimentu bola niekoľkokrát meraná pH simulovanej pľúcnej tekutiny s vláknami. Zmena pH pri rozklade vlákien môže tiež spôsobovať zápal, pokiaľ je nanovláknenná vrstva použitá napr. ako implantát. Samotná simulovaná pľúcna tekutina má pH 4,5. Po vložení vzoriek sa po desiatich minútach zvýšila pH tekutiny u všetkých vzoriek na hodnotu v rozmedzí 7 – 8, po siedmich dňoch trvania experimentu dochádzalo už len k miernemu zvýšeniu pH (tab. 8). Hodnoty pH boli zisťované pomocou pH papierikov.

Tab. 8: Hodnoty pH u jednotlivých elektrostaticky zvláknených materiálov po vložení do simulovanej pľúcnej tekutiny a po 7.-ich dňoch.

	pH po vložení do SLF	pH po 7.-ich dňoch
PVA (1)	7	8
PVA (2)	7	8
PVA (3)	7	8
PVA/PAA (1)	7	7,5
PVA/PAA (2)	7,5	8
PVA/PAA (3)	7	7,5
PEOEMA (1)	7	7
PEOEMA (2)	7	8
PEOEMA (3)	7	8
HEMA/EOEMA (1)	8	8,5
HEMA/EOEMA (2)	8	9
HEMA/EOEMA (3)	8	8,5
PUR 5 (1)	7,5	8,5
PUR 5 (2)	7	7,5
PUR 5 (3)	7	7,5
PUR 6 (1)	7	8
PUR 6 (2)	7	7,5
PUR 6 (3)	7	8
PAN (1)	7	8
PAN (2)	7	7,5
PAN (3)	7	7,5

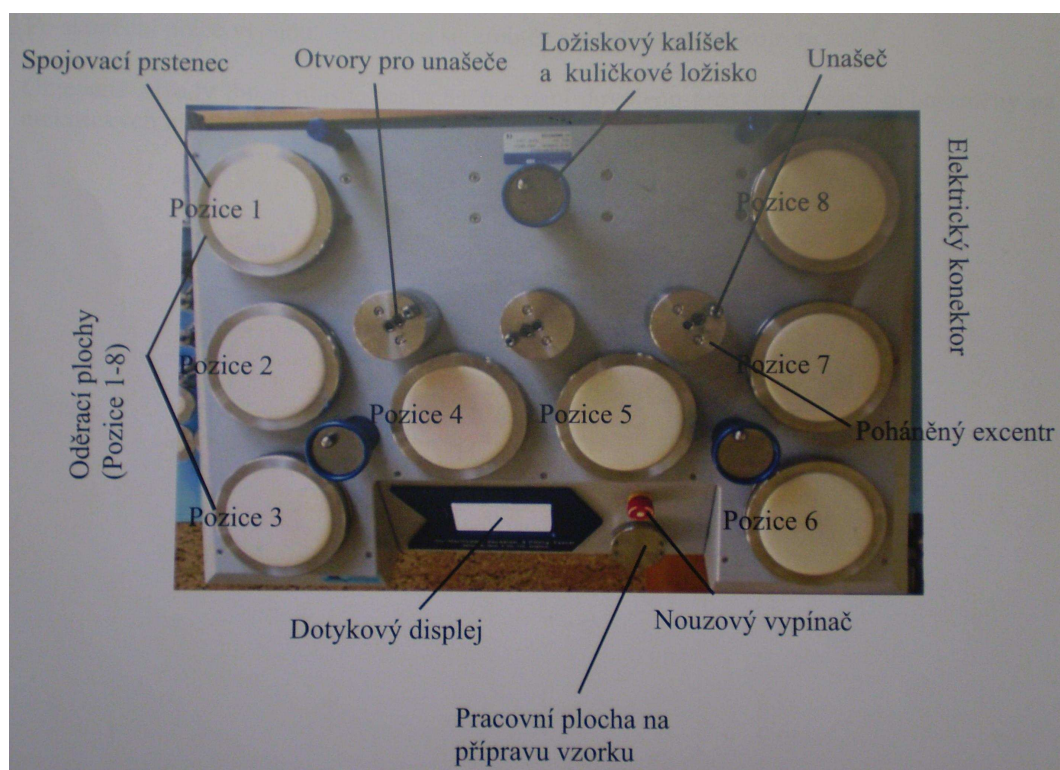
3.4 Experiment 2 - Oddelovanie vlákien z nanovlákných vrstiev

V tejto kapitole sú popísané dva experimenty, ktoré hodnotia oddelovanie vlákien z nanovlákných vrstiev. Bolo použité zariadenie na zisťovanie oderu klasických textílií Nu-Martindale 864 a komorový žmolkovací prístroj (kap. 3.2). U oboch experimentov je zisťovaný váhový úbytok testovaných elektrostaticky zvláknených vlákných materiálov popísaných v tab. 6.

3.4.1 Oddelovanie vlákien z nanovlákných vrstiev s použitím zariadenia Nu-Martindale 864

Z nanovlákných materiálov sa vystrihli vzorky v tvare kruhu s priemerom 32 mm, tie sa vložili do držiakov vzoriek a spojovacími tyčami sa upevnili do unášača. Na digitálnom počítadle sa nastavil počet otáčok, v tomto prípade 5, pretože ide o veľmi jemné materiály a vzorky by sa mohli zničiť. Na obr. 24 je popis pracovných častí zariadenia. Tlak na vzorky bol približne 1 480 Pa, spôsobený len váhou držiakov a spojovacích tyčí, žiadne prídavné závažie sa nepoužilo. Samotný oder spočíval v tom, že unášač sa pohyboval v tvare Lissajousových obrazcov a vzorky sa odierali o normovanú vlnársku tkaninu.

Príloha C obsahuje fotodokumentáciu vzoriek nanovlákných materiálov v držiakoch pred oderom a po odere.



Obr. 24: Popis pracovních částí zariadenia Nu-Martindale 864.

Pred a po odieraní boli vzorky zvážené a bol zistený úbytok nanovláknenného materiálu v percentách (tab. 9). Hmotnosti sú uvádzané aj s držiakmi vzoriek. Držiaky boli najprv zvážené samostatne a potom aj s testovanými vzorkami. Hmotnosti držiakov sa následne odčítali a zistili sa úbytky hmotností samotných vzoriek. Dôvodom bolo, že testované vzorky boli veľmi malé a pri manipulácii s nimi by mohlo dochádzať ku skresľovaniu výsledkov.

Tab. 9: Hmotnosti vzoriek pred oderom a po odere a úbytok hmotnosti na zariadení Nu-Martindale 864.

	Hmotnosť vzorky s držiakom pred oderom [g]	Hmotnosť vzorky s držiakom po odere [g]	Úbytok hmotnosti vzorky [%]
PVA	164,81421	164,81311	3,74
PVA/PAA	164,96482	164,96465	0,35
PEOEMA	165,08714	165,08642	0,95
HEMA/EOEMA	164,77571	164,77127	88,12
PUR 5	165,43235	165,43096	6,63
PUR 6	164,73473	164,73431	2,86
PAN	165,36341	165,36282	1,92

3.4.2 Oddel'ovanie vlákien z nanovláknenných vrstiev s použitím komorového žmolkovacieho prístroja

Komorový žmolkovací prístroj stanovuje skúšobnú metódu pre zisťovanie odolnosti plošných textílií proti žmolkovaniu a rozvlákneniu, ale v tomto prípade bol experiment navrhnutý k zisteniu úbytku hmotnosti testovaných vzoriek.

Nanovláknenné materiály boli najprv zvážené a potom vložené do komôr žmolkovacieho prístroja. V každej komore bola jedna vzorka. Podstatou skúšky bolo, že sa vzorky pohybovali v komorách vyložených korkom, pričom sa odierali o steny komory. Po jednej minúte a po dvoch minútach odierania boli vzorky odvážené a hodnoty zaznamenané do tab. 10. Tab. 11 obsahuje úbytky hmotnosti vzoriek po jednej minúte a po dvoch minútach oderu v percentách. Graf č. 4 vyjadruje percentuálny úbytok hmotnosti elektrostaticky zvláknenných testovaných vrstiev po jednej a dvoch minútach oderu.

Tab. 10: Hmotnosti vzoriek pred oderom, po jednej minúte a po dvoch minútach odierania.

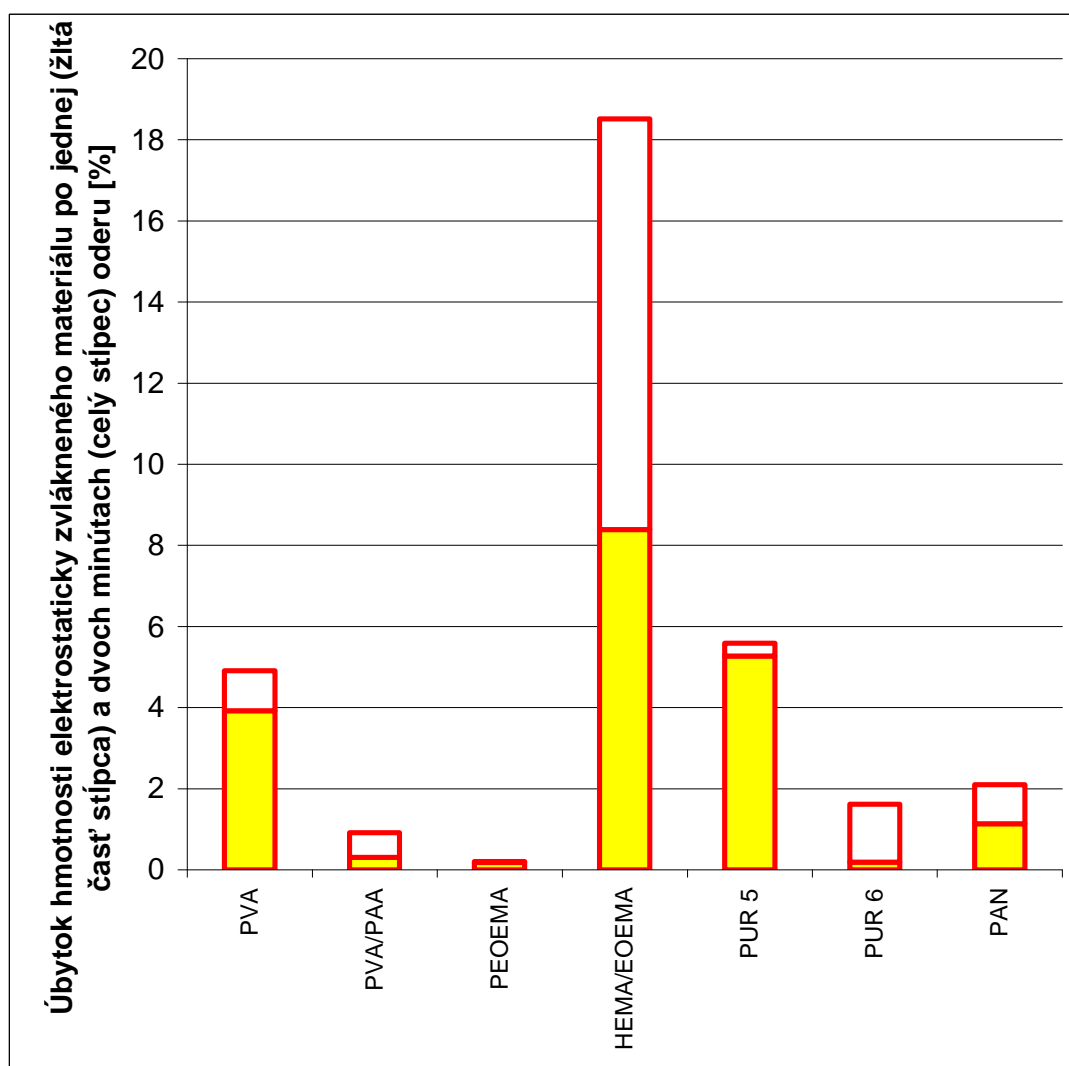
	Hmotnosť vzorky pred oderom [g]	Hmotnosť vzorky po 1 min oderu [g]	Hmotnosť vzorky po 2 min oderu [g]
PVA	0,05154	0,04952	0,04901
PVA/PAA	0,03921	0,03909	0,03885
PEOEMA	0,13796	0,13771	0,13768
HEMA/EOEMA	0,03408	0,03122	0,02777
PUR 5	0,03812	0,03611	0,03599
PUR 6	0,10922	0,10901	0,10744
PAN	0,11523	0,11392	0,11281

Tab. 11: Úbytky hmotností vzoriek po jednej minúte a po dvoch minútach odierania.

	Úbytok hmotnosti po 1 min oderu [%]	Úbytok hmotnosti po 2 min oderu [%]
PVA	3,92	4,91
PVA/PAA	0,31	0,92
PEOEMA	0,18	0,20
HEMA/EOEMA	8,39	18,52
PUR 5	5,27	5,59
PUR 6	0,19	1,62
PAN	1,14	2,10

Hodnoty hmotností v tab. 9 a 10 sú zámerne uvádzané na 5 desatinných miest. Hmotnosti vzoriek testovaných materiálov sú veľmi malé a bolo potrebné zistiť ich rozdiely pred a po odere, preto sa pri experimentoch použili váhy s veľkou presnosťou.

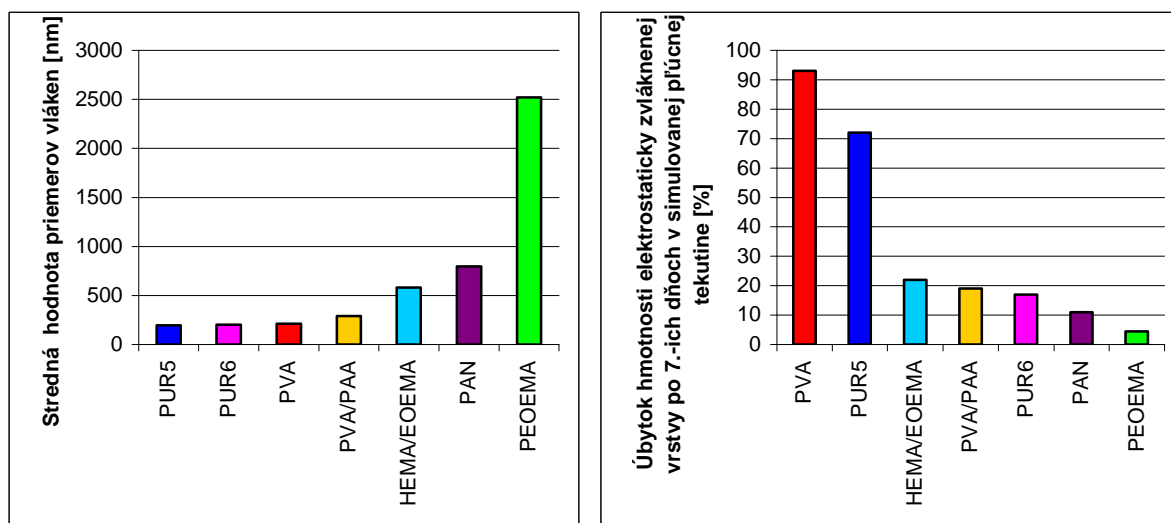
Graf č. 4: Graf vyjadrujúci percentuálny úbytok hmotnosti elektrostaticky zvláknených testovaných vrstiev po jednej a dvoch minútach oderu.



4 Diskusia

Výsledky experimentu 1 v porovnaní so zistenými priermi vláken zhruba ukazujú logickú informáciu, že čím väčší je priemer vláken u testovaného materiálu, tým menší je úbytok materiálu po 7-ich dňoch testovania. Táto informácia jednoznačne prichádza vhod a ukazuje, že extrémne malý priemer vláken znamená i dosť dobrú rozpustnosť s ohľadom na relatívne veľký merný povrch týchto elektrostaticky zvláknených nanovláken. Je ale zrejmé, ako je vidieť z grafov nižšie, že to neplatí jednoznačne a určite záleží aj na použitom materiále pre výrobu nanovláken.

Graf č. 5: Porovnanie strednej hodnoty priemerov vláken použitých v elektrostaticky zvláknených materiáloch s percentuálnym úbytkom hmotnosti týchto materiálov po 7-ich dňoch v simulovanej pľúcnej tekutine.



Podľa publikácií [10, 20] zavádzajúcich tento test pre testovanie sklenených vláken klasických rozmerov sú výsledky testov považované za dobré, pokiaľ sa za 7 dní rozpustí najmenej polovica hmotnosti vloženého vzorku. Podľa tohoto predpokladu vyhovel len dve vzorky tých najjemnejších vláken, a to nanovlákná polyvinylalkoholu (PVA) a polyuretánu (PUR 5). Výsledky u PEOEMA nie sú zrejmé preukázateľné, aj keď ukazujú najnižšiu

hodnotu úbytku, pretože podľa snímku zo SEM nebol tento materiál jednoznačne vlákenný. Vlákná boli dosť polepené a išlo skôr o materiál s charakterom zvrásnenej fólie. Nie je teda ani možné zavádzať preňho normy ako pre ostatné vlákenné materiály.

Avšak, pozornosť priťahujú výsledky ďalších štyroch vzoriek a to PVA/PAA (19 %), PUR 6 (17 %), PAN (11 %) a kopolymér HEMA/EOEMA (22 %). U ani jednej z týchto vzoriek nedošlo k rozpusteniu viac než štvrtiny hmotnosti testovaného materiálu. Logicky to vyplýva zo základnej chemickej podstaty použitých polymérnych materiálov, ktorých rozbor však nie je zmyslom tejto diplomovej práce. Prekvapivá je veľmi nízka hodnota pre vzorku PVA/PAA, aj keď je to pôvodne materiál zvlákňovaný z vodného roztoku. Zrejme dokonalé sieťovanie, teda stabilizácia voči vode, spôsobili tento jav.

Vyššie uvedené hodnoty úbytkov hmotností u štyroch testovaných materiálov možno považovať za negatívny výsledok, ale je nutné brať do úvahy ďalšie okolnosti, a to:

- a) V pľúcach prebieha zrejma cirkulácia pľúcnej tekutiny a z toho dôvodu sú presnejšie testy dynamické.
- b) Je nutné podrobné testovanie s väčším počtom vzoriek porovnateľných hmotností.
- c) Je nutné pokúsiť sa testovať vzorky i dlhšiu dobu, než 7 dní, pretože norma je stanovená pre sklenené vlákna na základe čisto empirických poznatkov, ako je uvedené v publikáciách [76, 77].
- d) Pri použití tohoto testu sa predpokladá, že sa zo vzorky vlákennej vrstvy oddelia jednotlivé vlákna, príp. jeho časti a vniknú do dýchacieho ústrojenstva a potom pokračujú ďalej až do pľúc. Pokiaľ ale nie je dokázané, že sa z daného materiálu s negatívnymi dôsledkami jednoznačne dajú oddeliť jednotlivé vlákna a že teda pri bežnej manipulácii či pri výrobe je možné takéto oddeľovanie vlákien, potom nie je nutné znepokojovať sa.
- e) Zatiaľ nie je v žiadnej literatúre jednoznačne popísané, aké množstvo (v gramoch) usadeného materiálu v pľúcach spôsobuje negatívne reakcie organizmu, pokiaľ sa nerozpustí v pľúcnej tekutine. Z toho opäť vyplýva, že negatívny výsledok z testu prevedeného v tejto práci nemá jednoznačne negatívny záver.

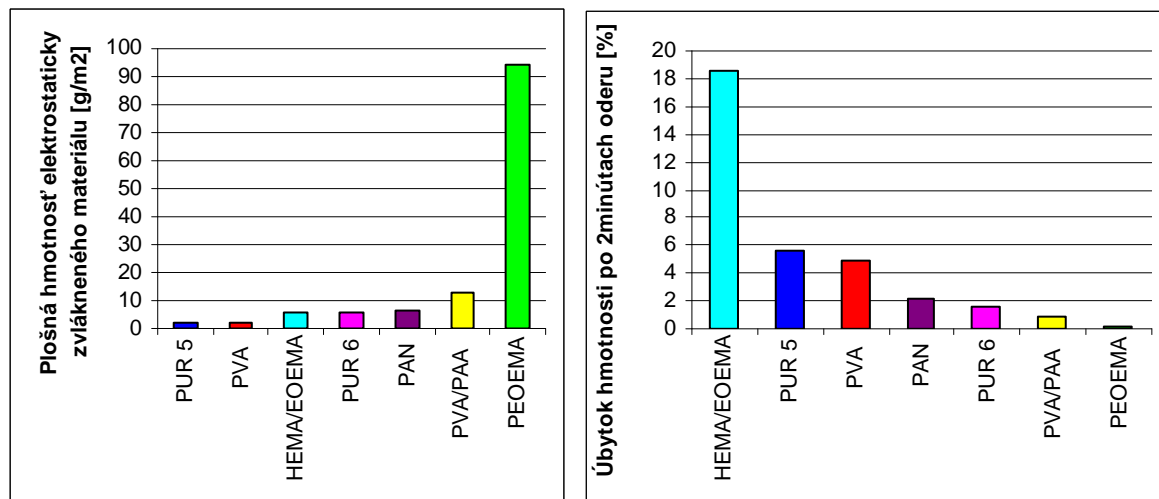
Modifikovaná statická metóda je najjednoduchšou metódou testovania bioperzistencie vlákien v simulovanej pľúcnej tekutine. Pre ďalšie testovanie je možné doporučiť porovnanie výsledkov statických a dynamických testov *in vitro* s rovnakými elektrostatickými vlákennými materiálmi. Nasledovať by mohli testy *in vivo*, tie sú ale časovo aj finančne náročné a sú k tomu potrební kvalifikovaní odborníci a vhodné priestory na zaistenie sterilného a hygienického prostredia.

Experiment 2 prevádzaný či už na zariadení Nu-Martindale 864 alebo na komorovom žmolkovacom prístroji ukázal, že pri odieraní použitých vlákenných materiálov došlo k určitému úbytku hmotnosti u všetkých vzoriek. Dochádzalo k oddeľovaniu väčších častí, akýchsi „žmolkov“, ale je otázne, či sa neoddelili aj časti, príp. častice ľudským okom neviditeľné. A práve tie by sa teoreticky mohli dostať do ľudského organizmu a negatívne ovplyvňovať ďalší vývoj v tele človeka. Preto je potrebné venovať pozornosť nielen úbytkom materiálu pri odieraní, ale aj tomu, ako vyzerá materiál celkovo, napr. v akej forme sa vlákna odierajú. Ak by sa dala použiť terminológia klasických tkanín a pletenín, tak napr. u PUR 5 a PUR 6, či u PVA dochádza akoby k porušeniu „väzbových bodov“, u vzorky PAN sa vytvára „žmolkovitý“ povrch a u PVA/PAA nie je voľným okom pozorovaná žiadna zmena, aj keď k úbytku hmotnosti došlo (viď. príloha C).

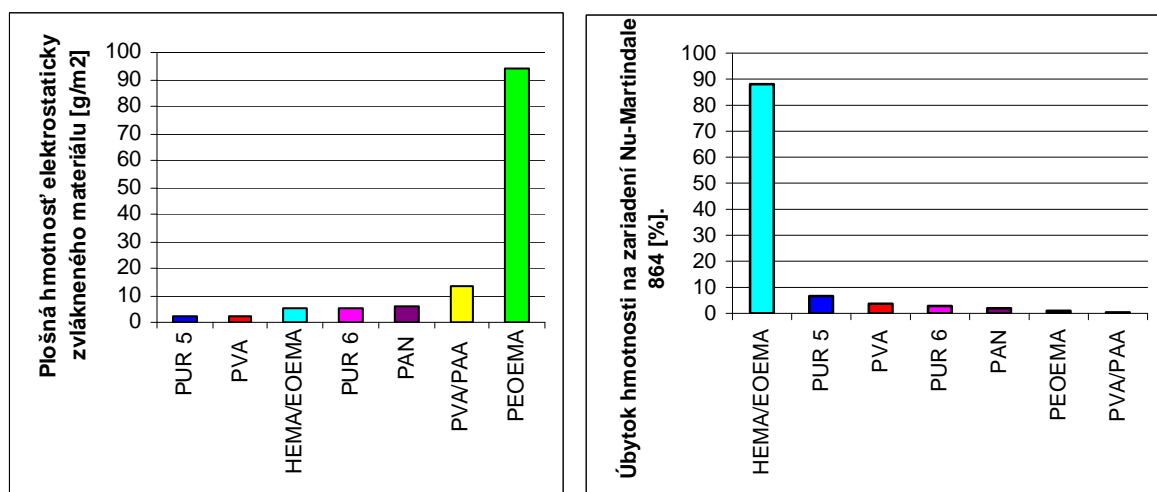
Z nižšie uvedených grafov (graf č. 6 a 7) zhruba vyplýva, že čím je menšia plošná hmotnosť, tým väčší je úbytok pri odere. Platí to pre obidve použité zariadenia, ako pre Nu-Martindale 864, tak aj pre komorový žmolkovací prístroj. To vlastne logicky ukazuje nato, že jemnejší materiál sa lepšie odiera, ale mohlo by to aj znamenať väčšie potenciálne riziko.

Otázkou však aj naďalej zostáva, ako sú tieto testy podobné bežnému namáhaniu materiálov pri manipulácii s ním pri ich výrobe, spracovaní a testovaní. Dôležité je, že tieto testy sú objektívne a reprodukovateľné, s jednoznačne danou záťažou, podmienkami a opakovaním.

Graf č. 6: Porovnanie plošnej hmotnosti elektrostaticky zvláknených materiálov s percentuálnym úbytkom hmotnosti po dvoch minútach odierania na komorovom žmolkovacom prístroji.



Graf č. 7: Porovnanie plošnej hmotnosti elektrostaticky zvláknených materiálov s percentuálnym úbytkom hmotnosti na zariadení Nu-Martindale 864.



Pre ďalšie testovanie je možné doporučiť napr. využitie klasického svetelného mikroskopu. Nanovláknenný materiál by sa mohol definovane odierať o určitú tkaninu, jej kúsok by sa potom vložil medzi podložné a krycie sklíčko a svetelným mikroskopom by sa zisťovalo, či na tkanine ostali nejaké kúsky, príp. časti vlákien.

Ako však už bolo spomenuté, neexistuje žiadne zariadenie hodnotiace oddeľovanie nanovláknenných častí z nanovláknenných materiálov.

5 Záver

Z obsahu tejto diplomovej práce jednoznačne vyplýva, že otázky týkajúce sa testovania zdravotných rizík nanovláknenných materiálov sú veľmi pálčivé a je nutné sa im v dostatočnej miere venovať.

Teoretická časť, v ktorej je zakomponovaná aj obsiahlejšia rešeršná časť, predstavuje niekoľko výskumov venujúcich sa testovaniu zdravotných rizík nanočastíc, nanovláken, ale aj vláknenných materiálov. Z týchto výskumov jednoznačne vyplýva, že existujú materiály s rozmermi „nano“, ktoré môžu vyvolávať negatívne reakcie, ak sa dostanú do ľudského tela. Preto je určite nutné, aby všetci výskumníci, výrobcovia i spotrebitelia pracujúci s nanovláknami kládli dôraz na bezpečnosť pri práci, už len z toho dôvodu, že nikto nedokáže s určitosťou povedať, čo môže konkrétny nanovláknenný materiál spôsobiť po prieniku do živého organizmu. Rešeršná časť tiež ukazuje, ako už bolo povedané v texte predtým, že zatiaľ neexistujú žiadne štandardy a normy, podľa ktorých by sa mali nanovláknenné materiály, čo sa týka ich zdravotnej nezávadnosti, testovať. V literatúre je tiež veľmi málo publikácií s touto problematikou a len minimum článkov sa venuje konkrétne elektrostaticky zvláknenným nanovláknenným materiálom, na ktoré sa aspoň základne zamerala táto diplomová práca.

V experimentálnej časti sú predstavené dva druhy testovania „súdržnosti“ elektrostaticky zvláknenných nanovláknenných vrstiev zameraných na možné oddeľovanie jednotlivých častí, príp. vláken z materiálu. Tieto pokusy boli prevádzané na zariadeniach určených k testovaniu oderu pre textílie v klasickom slova zmysle, teda pre plošné textílie tvorené hlavne mikrovláknennými materiálmi. Ukázalo sa, že sa dajú zmerať úbytky hmotnosti jednotlivých vzoriek bez ich úplnej deštrukcie, ale nie je zrejmé, či môžu tieto testy napodobňovať bežnú manipuláciu a namáhanie elektrostaticky zvláknenných vrstiev v praxi. Bolo by vhodnejšie vyvinúť ďalšie testy zamerané špeciálne na elektrostaticky zvláknenné nanovláknenné materiály.

Experimenty zamerané na testovanie rozpustnosti elektrostaticky zvláknenných nanovláken v simulovanej pľúcnej tekutine predpokladajú, že daný nanovláknenný materiál či jeho časť môžu vniknúť do dýchacieho ústrojenstva ako do najprístupnejšej časti ľudského organizmu s hľadiska prieniku nanočastíc a dostať sa tak až na „koniec“ svojej pomyslenej cesty, teda do pľúc. Miera negatívneho pôsobenia takýchto nanovláken je potom daná ich rozpustnosťou či nerozpustnosťou práve v pľúcnej tekutine. Tento jednoduchý test ukázal, že

je potrebné venovať pozornosť zdravotným rizikám i u elektrostaticky zvláknených materiálov vyrábaných na Technickej univerzite v Liberci na Katedre netkaných textílií, pretože väčšina testovaných materiálov nedosiahla po siedmich dňoch v simulovanej pľúcnej tekutine rozpustenia aspoň polovice hmotnosti vzoriek, ako je požadované v testoch popísaných v teoretickej časti. Avšak, tento test nie je testom rozhodujúcim a jednoznačným. Pre prehľad o zdravotných rizikách elektrostaticky zvláknených nanovláken je to len prvotná vstupná informácia. Je samozrejme nutné sústrediť sa ďalej i na podrobnejšie a rozsiahlejšie testy in vitro a následne na testy in vivo.

Vedci sa vo svojich výsledkoch zhodujú, že presná identifikácia zdravotných a ekologických rizík je bezpodmienečne nutnou podmienkou pre úspešné zavedenie nanočastíc a nanovláken v budúcich spotrebiteľských aplikáciách. Celá rada lekárov a prírodovedcov, ale tiež ekologické a spotrebiteľské organizácie sa preto vyslovujú za urýchlené stanovenie zákonných pravidiel pre testovanie bezpečnosti výrobkov založených na nanotechnológiách.

Záverom je potrebné ešte raz poznamenať, že táto diplomová práca sa snažila poukázať na možné zdravotné riziká práce s elektrostaticky zvláknenými nanovláknami a preukázala, že i u materiálov bežne vyrábaných a spracovávaných na TUL nie je jednoznačná zdravotná nezávadnosť a je preto viac ako nutné sa tejto problematike podrobnejšie venovať.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Borm, P., Robbins, D., Haubold, S., Kuhlbusch, T., Fissan, H., Donaldson, K., Schins, R., Stone, V., Kreyling, W., Lademann, J., Krutmann, J., Warheit, D., Oberdorster, E.: Particles and Fibre Toxicology, BioMed Central, 3:11 Review, 2006 , Dostupné na: <http://www.particleandfibretoxicology.com/com/content/3/1/11>
- [2] Dostupné na:
<<http://exfyz.upol.cz/didaktika/oprlz/nanotechnologie.pdf>> [15. 10. 2008]
- [3] Dostupné na:
<https://skripta.ft.tul.cz/databaze/list_skr.cgi?program=2&obor=5&zamereni=11&predmet=24&skripta=105&pro> [6. 3. 2008]
- [4] Dostupné na:
<<http://www.zkusebni-technika.cz/martindale.htm>> [20. 4. 2009]
- [5] Košťáková, E., et al.: Composite nanofibers produced by modified needleless electrospinning, Material letters, (accepted to publication in 2007)
- [6] Dostupné na:
<<http://www.inovace.cz/for-high-tech/inovace-v-oborech/clanek/elmarco--vyrobce-nanovlaken--posiluje-vyzkum>> [7.1.2009]
- [7] Dostupné na:
<<http://alice.fiserovi.cz/wp-content/uploads/2007/06/nanotextilie.pdf>> [17. 12. 2008]
- [8] Dostupné na:
<<http://www.ft.tul.cz/depart/knt/nanotex/2.predn%C3%A1ska%20final.pdf>> [5. 1. 2009]
- [9] Šišková, A.: Studium stabilizace elektrostaticky zvlákněných nanovrstev, diplomová práce, TUL, 2006
- [10] Štefaňáková, L.: Studium karbonizace elektrostaticky zvlákněných nanovláken, diplomová práce, TUL, 2006
- [11] Dostupné na:
<<http://www.21stoleti.cz/view.php?cislocclanku=2006021717>> [28.11. 2007]
- [12] Dostupné na:
<<http://alice.fiserovi.cz/wp-content/uploads/2007/06/nanotextilie.pdf>> [20. 12. 2008]
- [13] Dostupné na:
<http://www.khsova.cz/01_aktuality/nanotechnologie.php?datum=2009-03-18> [25. 5. 2009]

- [14] Dostupné na:
<<http://www.kompozity.info/index.php?pr=15&uid=&id>> [25. 5. 2009]
- [15] Lukas D., Sarkar A., Pokorny P.: Self organization of jets in electrospinning from free liquid surface - a general approach, *Journal of Applied Physics*, 103, 8, 15. duben 2008.
- [16] Dostupné na:
<http://www.hzp.cz/main/dotazy_on.php?tema=9&id=3913&p_str=>> [26. 5. 2009]
- [17] Dostupné na:
<<http://www.eastlabs.biz/article/439/SID=g29gbj4c1clsnlopudavn8tkg1>> [17. 5. 2009]
- [18] Dostupné na:
<<http://lupus.klok.cz/slovnicek/makrofag>> [13. 1. 2009]
- [19] Dostupné na:
<http://www.ivanabouckova.respinet.com/Generic/servlet/Main.html;jsessionid=444EC43B9C928706D94515FECF53D94B?p_pageid=95347> [14. 2. 2009]
- [20] Studničková, J. a kol.: In: 14th International Conference STRUTEX (Structure and Structural Mechanics of Textile Fabrics), Liberec, November 2007. Liberec, Technická univerzita v Liberci 2007, s. 263-268. ISBN 978-80-7372-271-5.
- [21] Dostupné na:
<<http://www.onkologickecentrum.cz/downloads/laboratore/imunologie/clanky/Fagocytoza.pdf>> [16. 2. 2009]
- [22] Dostupné na:
<<http://lekarske.slovniky.cz>> [19. 4. 2009]
- [23] Dostupné na:
<http://dsp.vscht.cz/konference_matlab/matlab04/salacova.pdf> [20. 4. 2009]
- [24] Dostupné na:
<http://www.sci.muni.cz/~sulovsky/Vyuka/Lab_metody/Elektronova%20mikroskopie.pdf> [24. 4. 2009]
- [25] Lin, T., et al. (2003). Chemistry of carbon nanotubes. *Aust. J. Chem.* **56**, 635–651.
- [26] Bodian, D., and Howe, H. A. (1941). Experimental studies on intraneural spread of poliomyelitis virus. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* **LXVIII**, 248–267.
- [27] Dostupné na:
<<http://www.techtydenik.cz/detail.php?action=show&id=2515&mark>> [6. 1. 2009]
- [28] Ye, J., et al. (1999a). Critical role of glass fiber length in TNF-alpha production and transcription factor activation in macrophages. *Am. J. Physiol.* **276**(3 Pt. 1), L426–L434.

[29] Dostupné na:

<<http://74.125.77.132/search?q=cache:7bGapJpX0eYJ:www.ft.vslib.cz/depart/knt/nove/dokumenty/studmaterialy/ntt/nanoact.ppt+vlastnosti+nanovl%C3%A1ken+z+PVA&hl=cs&ct=clnk&cd=1&gl=cz>> [5. 1. 2009]

[30] Dostupné na:

<<http://suta.blog.respekt.cz/c/9695/Nanotechnologie-Velke-prisliby-i-znacna-rizika-nanotrubic.html>> [18. 5. 2008]

[31] Dostupné na:

<<http://translate.google.cz/translate?hl=cs&sl=en&u=http://scienceandreason.blogspot.com/2006/12/do-carbon-nanotubes-present-health.html&sa=X&oi=translate&resnum=1&ct=result&prev=/search%3Fq%3Dcorbon%2Bnanotubes%2Bin%2Bvivo%2Bhealth%2Bhazard%26hl%3Dcs%26lr%3D%26sa%3DG>>
[20. 5. 2008]

[32] Dostupné na:

<<http://translate.google.cz/translate?hl=cs&sl=en&u=http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008622305006081&sa=X&oi=translate&resnum>> [19. 5. 2008]

[33] Dostupné na:

<<http://www.vesmir.sk/?id=1391&PHPSESSID=db904b367a8a9b03447d6b077cb354a3>>
[13. 5. 2008]

[34] Dostupné na:

<<http://nanoarchitecture.net/article/?c=responsible-nanotechnology>> [21. 5. 2008]

[35] Dostupné na:

<<http://www.iom-world.org/research/nanoparticles.php>> [21. 5. 2008]

[36] Dostupné na:

<http://www.ft.tul.cz/bulletin/statni_doktorske_zkousky_a_obhajoby/teze-studnickova.pdf>
[18. 2. 2009]

[37] Dostupné na:

<http://www.enviweb.cz/?env=gmo_archiv_fifci/Rizika_nanocastic_pro_zdravi_a_jak_jim_celit.html> [20. 1. 2009]

[38] Chen, J., et al.: Fate, transport, transformation and toxicity of nanomaterials in conventional drinking water treatment process, V: Epa grantee meeting talk, [08-19-04].

[39] Dostupné na:

<http://www.rozhlas.cz/leonardo/lovek/_zprava/472818> [17. 3. 2009]

- [40] Dostupné na:
<<http://www.ft.vslib.cz/depart/ktm/files/20060106/VlastnostiVlaken-navody.pdf>> [1. 2. 2009]
- [41] Dostupné na:
<<http://www.nanotrading.sk/index.php?id=uvod>> [10. 1. 2009]
- [42] Dostupné na:
<<http://toxsci.oxfordjournals.org/cgi/content/full/92/1/5>> [12. 3. 2009]
- [43] Coin, P. G., Roggli, V. L., and Brody, A. R. (1994). Persistence of long, thin chrysotile asbestos fibers in the lungs of rats. *Environ. Health Perspect.* **102**(Suppl. 5), 197-199.
- [44] Dostupné na:
<<http://www.informapharmascience.com/doi/abs/10.1080/20014091111668>> [18. 3. 2009]
- [45] Warheit, D. B., Kellar, K. A., and Hartsky, M. A. (1992). Pulmonary cellular effects in rats following aerosol exposures to ultrafine Kevlar® aramid fibrils: Evidence for biodegradability of inhaled fibrils. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **116**, 225–239.
- [46] Dostupné na:
<<http://annhyg.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/41/2/217>> [11. 2. 2009]
- [47] Bellmann, B., et al.(2000) Inhalation tolerance study of p-aramid respirable fiber-shaped particulates (RFP) in rats. *Toxicol. Sci.* **54**, 237–250.
- [48] Dostupné na:
<<http://www.ingentaconnect.com/content/ap/rt/1999/00000030/00000002/art01344>>
[1. 1. 2009]
- [49] Searl, A., et al. (1999) Biopersistence and durability of nine mineral fibre types in rat lungs over 12 months. *Ann. Occup. Hyg.* **43**, 143–153.
- [50] Dostupné na:
<http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WPT-4GWBF55B&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=8d02bb196305139b90f550d9db9f5789>
[1. 4. 2009]
- [51] Dostupné na:
<<http://www.vscht.cz/sil/konference/letak3.pdf>> [9. 2. 2009]
- [52] Dostupné na:
<<http://annhyg.oxfordjournals.org/cgi/content/full/48/2/91>> [11. 2. 2009]
- [53] Dostupné na:
<<http://annhyg.oxfordjournals.org/cgi/content/full/46/2/135>> [11. 2. 2009]

[54] Dostupné na:

<http://toxsci.oxfordjournals.org/cgi/content/full/89/1/296> [16. 12. 2009]

[55] European Joint Research Centre. (1999) Sub-chronic inhalation toxicity of synthetic mineral fibres in rats (ECB/TM/16 rev. 1). In Bernstein DM, Sintes JMR, editors. Methods for the determination of the hazardous properties for human health of man-made mineral fibres (MMMMF). EUR 18748 EN. Ispra: European Commission Joint Research Centre.

[56] Kamstrup O, Davis JM, Ellehauge A, Guldberg M. (1998) The biopersistence and pathogenicity of man-made vitreous fibres after short- and long-term inhalation. *Ann Occup Hyg*; **42**: 191–9.

[57] Dörger M, et al. (2001) Differential responses of rat alveolar and peritoneal macrophages to man-made vitreous fibers *in vitro*. *Environ Res*; **A85**: 207–14

[58] IARC. (2002) IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Man-made vitreous fibres. Lyon: IARC.

[59] European Commission. (1997) Commission Directive 97/69/EC. *Off J*; **L343**: 19

[60] McConnell EE, Axten C, Hesterberg TW *et al.* (1999) Studies on the inhalation toxicology of two fibreglasses and amosite asbestos in the Syrian golden hamster. Part II. Results of chronic exposure. *Inhal Toxicol*; **11**: 785–835.

[61] Hesterberg TW, *et al.* (1998) Biopersistence of synthetic vitreous fibers and amosite asbestos in the rat lung following inhalation. *Toxicol Appl Pharmacol*; **151**: 262–75.

[62] Lee, K. P., Trochimowicz, H. J., and Reinhardt, C. F. (1985b). Transmigration of titanium dioxide particles in rats after inhalation exposure. *Exp. Mol. Pathol.* **42**, 331–343.

[63] Gilmour, P. S., Ziesenis, A., *et al.* (2004b). Pulmonary and systemic effects of short-term inhalation exposure to ultrafine carbon black particles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **195**, 35–44.

[64] Brown, et al. (2004) Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF-alpha cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **286**, L344–L353.

[65] Stone, V., et al. (1998) The role of oxidative stress in the prolonged inhibitory effect of ultrafine carbon black on epithelial cell function. *Toxicol. In Vitro* **12**, 649–659.

[66] Renwick, L. C., Donaldson, K., and Clouter, A. (2001). Impairment of alveolar macrophage phagocytosis by ultrafine particles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **172**, 119–127.

[67] Lam, C. W., et al. (2004). Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol. Sci.* **77**, 126–134.

[68] Warheit, D. B., et al. (1995). Contemporary issues in fiber toxicology. *Fundam. Appl. Toxicol.* **25**, 171–183.

- [69] Muller, et al. (2005). Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **207**, 221–231.
- [70] Shvedova, A. A., Kisin, E. R., Mercer, R., Schwegler-Berry, D., *et al.* (2005). Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **289**, L698–L708.
- [71] Mauderly, J. L., Cheng, Y. S., and Snipes, M. B. (1990). Particle overload in toxicological studies—Friend or foe. *J. Aerosol Med.* **3** (Suppl. 1), S169–S187.
- [72] Wilson, M. R., et al. (2002). Interactions between ultrafine particles and transition metals in vivo and in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **184**, 172–179.
- [73] ECETOC. (1996). Toxicology of Man-Made Organic Fibres. Technical Report No. 69. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Brussels, Belgium. p. 41.
- [74] Ghio, A. J., et al. (1998). Bronchoscopy in healthy volunteers. *J. Bronchology* **5**, 185–194.
- [75] Donaldson, K., Li, X. Y., Dogra, S., Miller, B. G., and Brown, G. M. (1992). Asbestos-stimulated tumor-necrosis-factor release from alveolar macrophages depends on fiber length and opsonization. *J. Pathol.* **168**, 243–248.
- [76] Helebrant, A., Strnadová, M., Šlemín, P: Koroze skelných vláken v plicních tekutinách, Příprava keramických materiálů, 6. seminář, str. 174-177, 2005
- [77] Zeisbergová, J.: Chemická degradace čedičových vláken, Diplomová práce, TUL,FT, KTM, 2003

Zoznam obrázkov

Obr. 1: Štruktúry uhlíkových nanotúb.

Obr. 2: a.), d.) Usporiadanie „armchair“, b.), e.) „chiral, c.), f.) zig-zag.

Obr. 3: Schéma elektrostatického zvlákňovania zo striekačky.

Obr. 4: Schéma elektrostatického zvlákňovania z voľného povrchu, z tyčky: 1-zdroj vysokého napätia, 2-kovová tyčka, 3-kvapka polymérneho roztoku alebo taveniny, 4-vznikajúce nanovláka, 5-uzemnený kolektor zachytávajúci nanovláka (vľavo); koniec kovovej kapiláry s polymérnym roztokom vytvarovaným do tvaru Taylorovho kužeľa (vpravo).

Obr. 5: Princíp technológie Nanospider: 1-rotujúci valec, 2-nádržka s polymérnym roztokom, 3-vznikajúce nanovláka, 4-nanovláčenná vrstva nesúca nanovláka, 5-uzemnený kolektor.

Obr. 6: Zariadenie Nanospider - priemyselná linka na výrobu nanovláč.

Obr. 7: Príklad úlohy bioperzistencie dlhých a krátkych vláč.

Obr. 8: Schematické usporiadanie a.) statického a b.) dynamického testu rozpúšťania vláč v simulovanej pľúčnej tekutine.

Obr. 9: Prenikanie zhukov uhlíkových nanotúb nedostatočne vyvinutou kožou u novorodencov do jedného roku života.

Obr. 10: Prechod zhuku uhlíkových nanotúb cez steny bunky z 24. 11. 2007.

Obr. 11: Snímok p-aramidových vláč a napojených RFP vláč z elektrónového mikroskopu; zväčšenie 3500x.

Obr. 12: Rastrovací elektrónový mikrograf ľudskej A549 pľúčnej epitelovej bunkovej kultúry (EPI) exponovanej p-aramidovým RFP vláčom (šípky) po jednom dni in vitro expozície; zväčšenie 1300x.

Obr. 13: Rastrovací elektrónový mikrograf ľudskej A549 pľúčnej epitelovej bunkovej kultúry (EPI) a alveolárneho makrofágu (M), p-aramidové RFP vláč (šípky) po jednom dni inkubácie; zväčšenie 800x.

Obr. 14: Snímky PVA zo skenovacieho elektrónového mikroskopu.

Obr. 15: Snímky PVA/PAA zo skenovacieho elektrónového mikroskopu.

Obr. 16: Snímok PEOEMA zo skenovacieho elektrónového mikroskopu.

Obr. 17: Snímky HEMA/EOEMA zo skenovacieho elektrónového mikroskopu.

Obr. 18: Snímky PUR 5 zo skenovacieho elektrónového mikroskopu.

Obr. 19: Snímky PUR 6 zo skenovacieho elektrónového mikroskopu.

Obr. 20: Snímky PAN zo skenovacieho elektrónového mikroskopu.

Obr. 21: Zariadenie Nu-Martindale 864.

Obr. 22: Komorový žmolkovací prístroj (vpravo), princíp zisťovania žmolkovitosti (vľavo).

Obr. 23: Inkubátor použitý pri experimente.

Obr. 24: Popis pracovných častí zariadenia Nu-Martindale 864.

Zoznam tabuliek

Tab. 1: Chemické zloženie vlákien podľa hmotnostného percenta.

Tab. 2: Stredná hodnota priemerov a dĺžok vlákien v mikrometroch.

Tab. 3: Chemické zloženie vlákien podľa hmotnostného percenta.

Tab. 4: Stredná hodnota priemerov a dĺžok vlákien v mikrometroch.

Tab. 5: Chemické zloženie hlavných zložiek testovaných vlákien v hmotnostných percentách.

Tab. 6: Elektrostaticky zvláknené materiály použité pri experimentoch.

Tab. 7: Váhové úbytky vzoriek a stredné hodnoty úbytkov vzoriek v percentách po 7.-ich dňoch v simulovanej pľúcnej tekutine - po odfiltrovaní a vysušení.

Tab. 8: Hodnoty pH u jednotlivých elektrostaticky zvláknených materiálov po vložení do simulovanej pľúcnej tekutiny a po 7.-ich dňoch.

Tab. 9: Hmotnosti vzoriek pred oderom a po odere a úbytok hmotnosti na zariadení Nu-Martindale 864.

Tab. 10: Hmotnosti vzoriek pred oderom, po jednej minúte a po dvoch minútach odierania.

Tab. 11: Úbytky hmotností vzoriek po jednej minúte a po dvoch minútach odierania.

Zoznam grafov

Graf č. 1: Odstraňovanie dlhých vlákien z pľúc potkanov v závislosti na čase.

Graf č. 2: Stredné hodnoty priemerov vlákien použitých vzoriek. Sivá čiara označuje hranicu 1000 nm.

Graf č. 3: Stredné hodnoty úbytkov vlákien použitých vzoriek.

Graf č. 4: Graf vyjadrujúci percentuálny úbytok hmotnosti elektrostaticky zvláknených testovaných vrstiev po jednej a dvoch minútach oderu.

Graf č. 5: Porovnanie strednej hodnoty priemerov vlákien použitých v elektrostaticky zvláknených materiáloch s percentuálnym úbytkom hmotnosti týchto materiálov po 7.-ich dňoch v simulovanej pľúcnej tekutine.

Graf č. 6: Porovnanie plošnej hmotnosti elektrostaticky zvláknených materiálov s percentuálnym úbytkom hmotnosti po dvoch minútach odierania na komorovom žmolkovacom prístroji.

Graf č. 7: Porovnanie plošnej hmotnosti elektrostaticky zvláknených materiálov s percentuálnym úbytkom hmotnosti na zariadení Nu-Martindale 864.

Zoznam príloh

Príloha A - Snímky použitých nanovláknenných materiálov zo skenovacieho elektrónového mikroskopu.

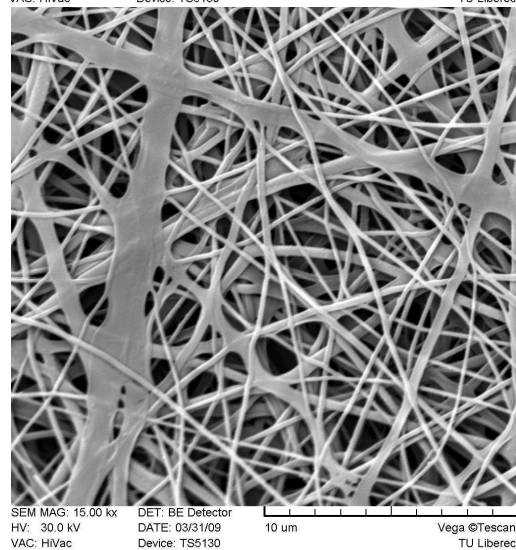
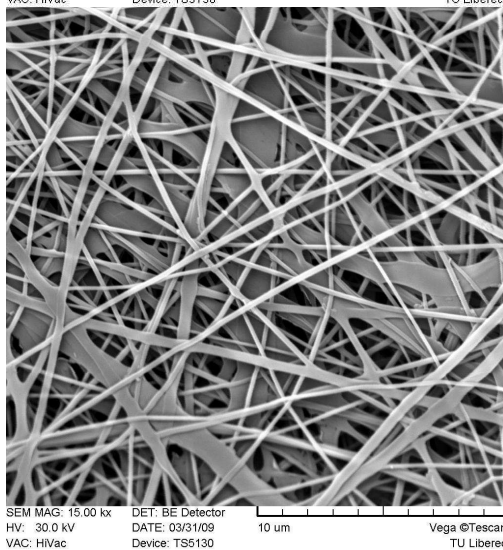
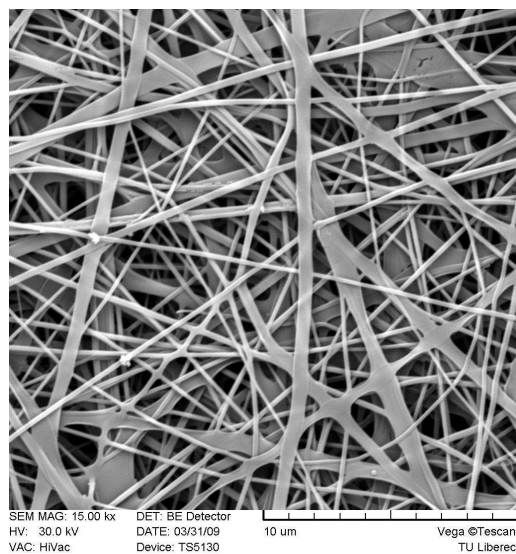
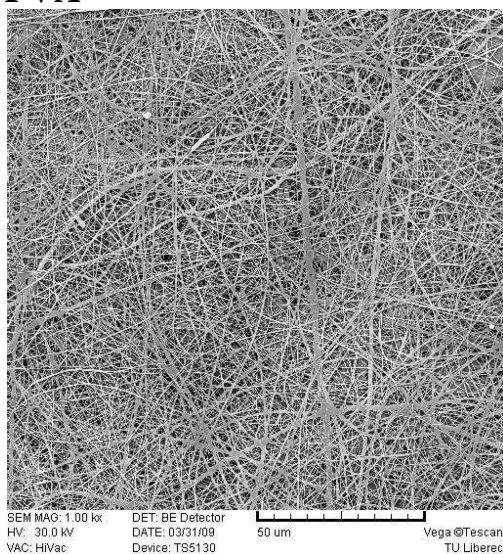
Príloha B - Zloženie simulovanej pľúcnej tekutiny s pH 4,5.

Príloha C - Vzorky z oderu nanovláknenných materiálov zo zariadenia Nu-Martindale 864.

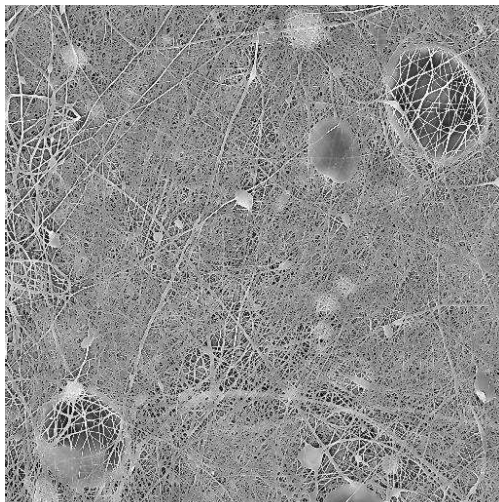
Príloha A

Snímky použitých nanovláknenných materiálov zo skenovacieho elektrónového mikroskopu.

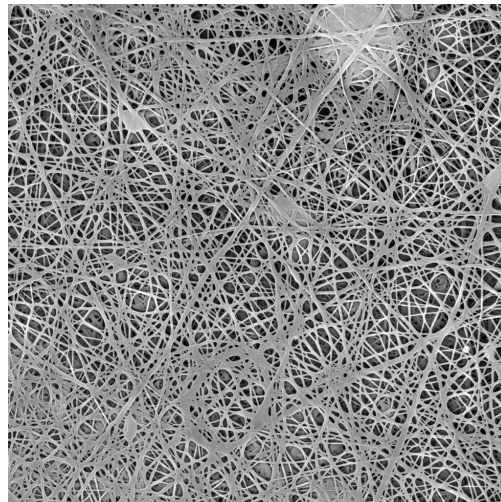
PVA



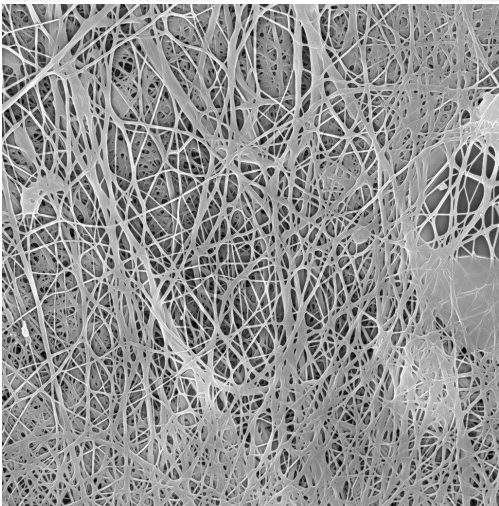
PVA/PAA



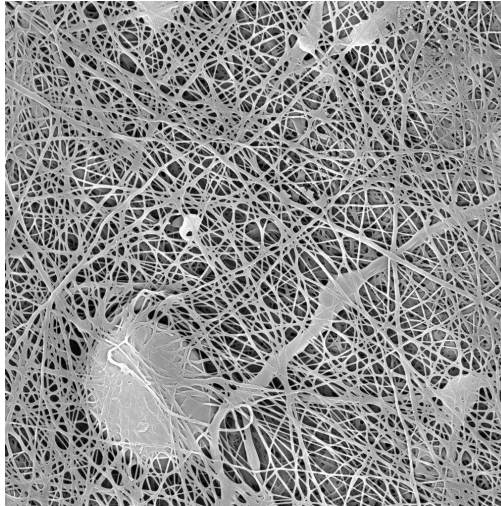
SEM MAG: 1.00 kx DET: BE Detector
HV: 30.0 kV DATE: 03/31/09
VAC: HiVac Device: TS5130
Vega ©Tescan
TU Liberec



SEM MAG: 5.00 kx DET: BE Detector
HV: 30.0 kV DATE: 03/31/09
VAC: HiVac Device: TS5130
Vega ©Tescan
TU Liberec

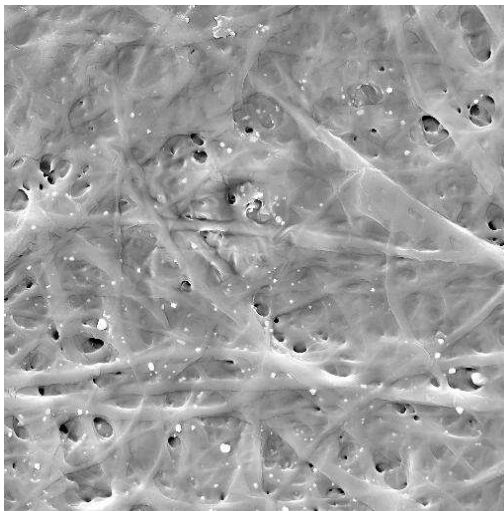


SEM MAG: 5.00 kx DET: BE Detector
HV: 30.0 kV DATE: 03/31/09
VAC: HiVac Device: TS5130
Vega ©Tescan
TU Liberec



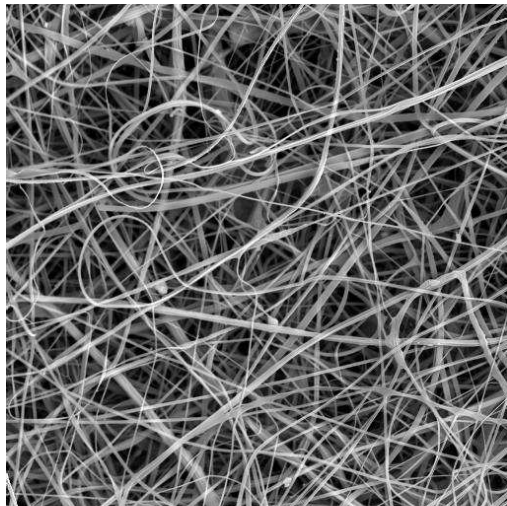
SEM MAG: 5.00 kx DET: BE Detector
HV: 30.0 kV DATE: 03/31/09
VAC: HiVac Device: TS5130
Vega ©Tescan
TU Liberec

PEOEMA

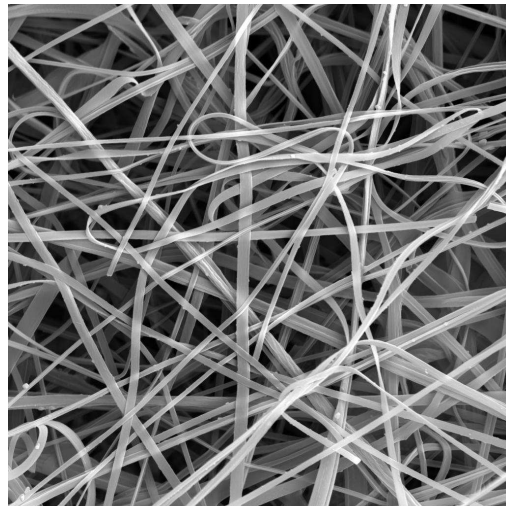


SEM MAG: 1.00 kx DET: BE Detector
HV: 30.0 kV DATE: 04/01/09
VAC: HiVac Device: TS5130
Vega ©Tescan
TU Liberec

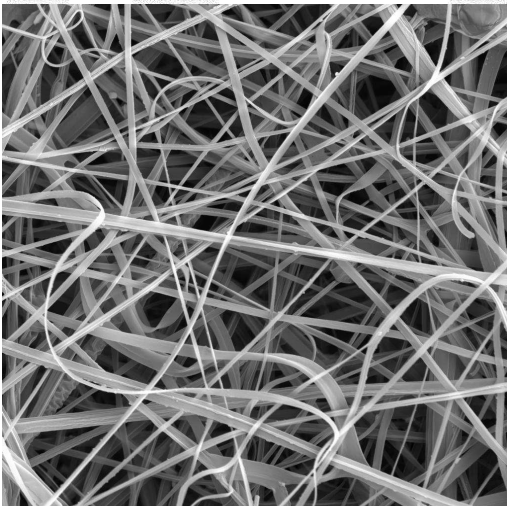
HEMA/EOEMA



SEM MAG: 1.00 kx
HV: 30.0 kV
VAC: HiVac
DET: BE Detector
DATE: 04/01/09
Device: TS5130
50 μm
Vega ©Tescan
TU Liberec

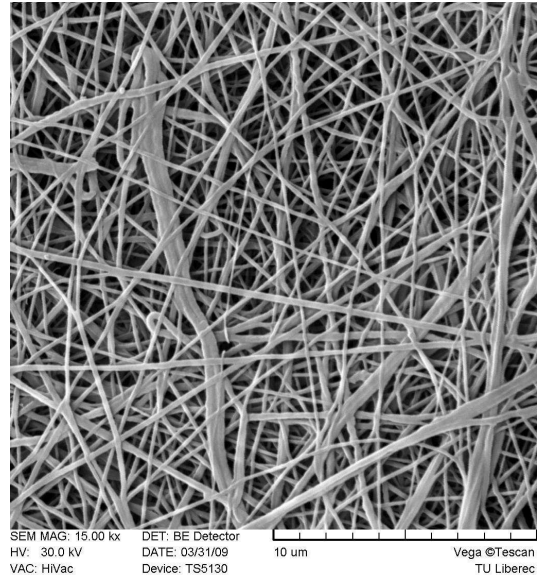
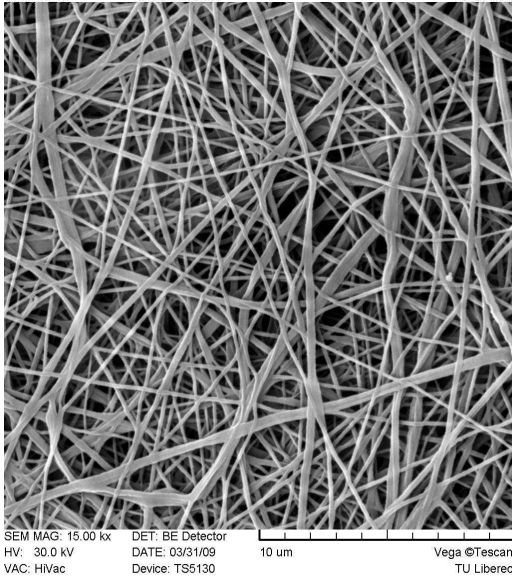
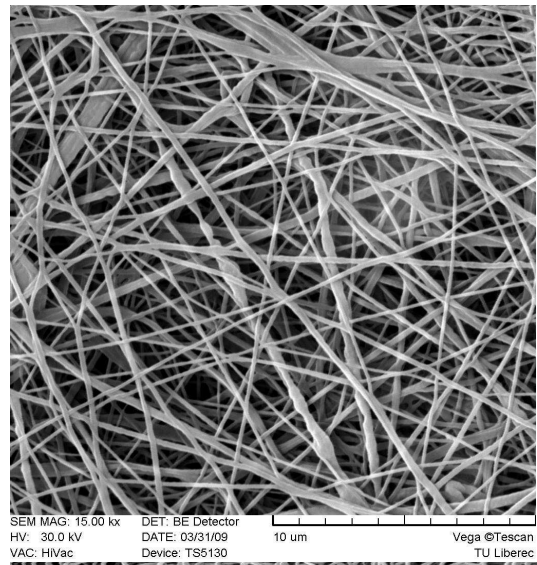
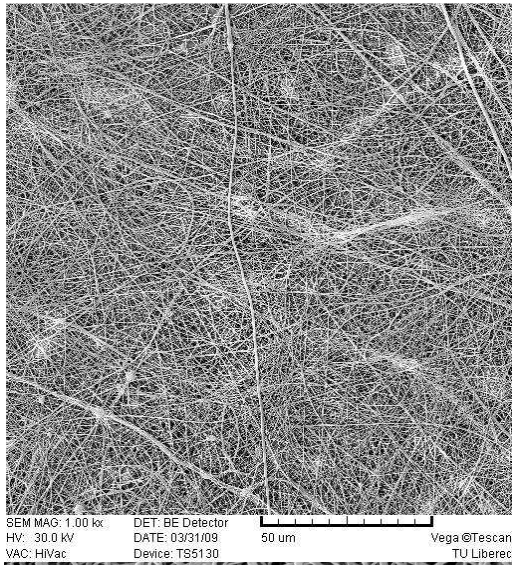


SEM MAG: 5.00 kx
HV: 30.0 kV
VAC: HiVac
DET: BE Detector
DATE: 04/01/09
Device: TS5130
20 μm
Vega ©Tescan
TU Liberec

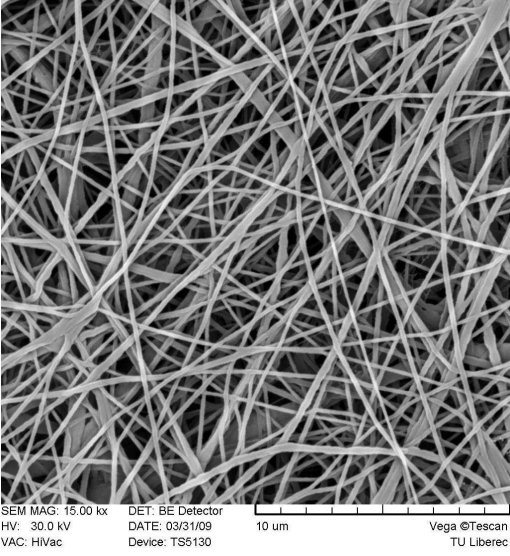
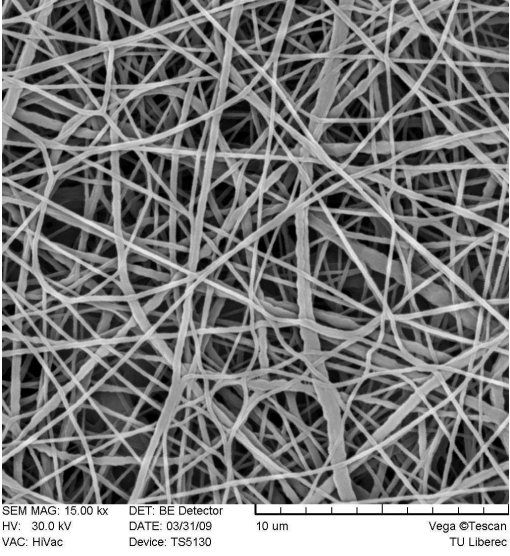
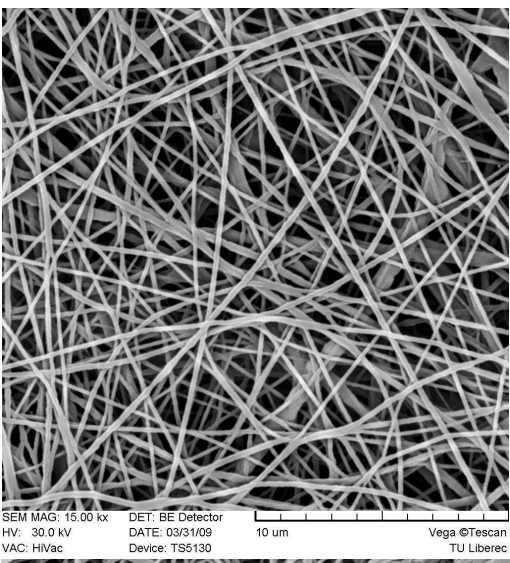
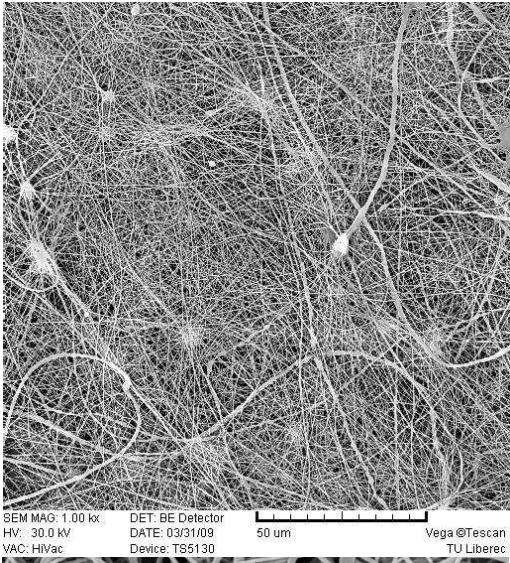


SEM MAG: 5.00 kx
HV: 30.0 kV
VAC: HiVac
DET: BE Detector
DATE: 04/01/09
Device: TS5130
20 μm
Vega ©Tescan
TU Liberec

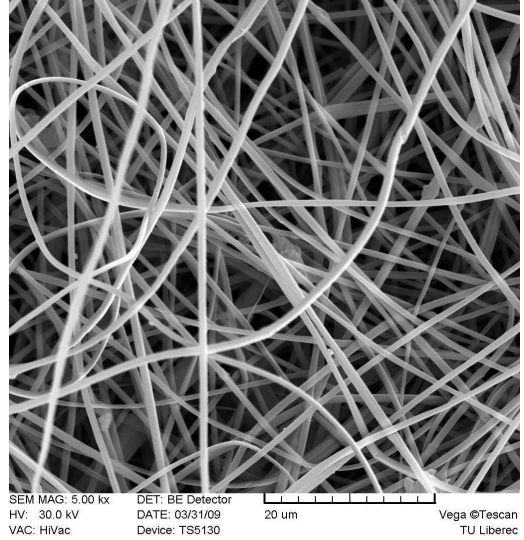
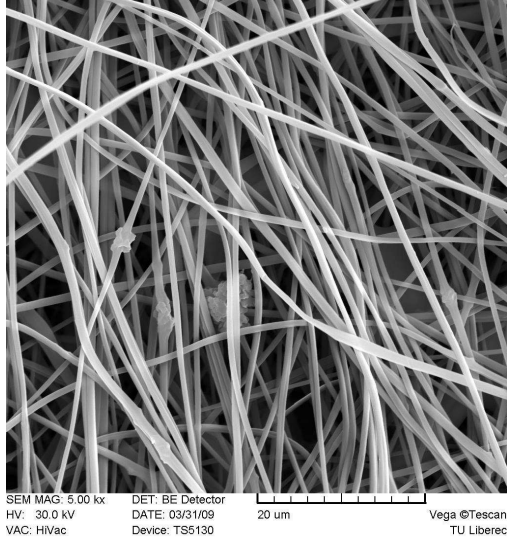
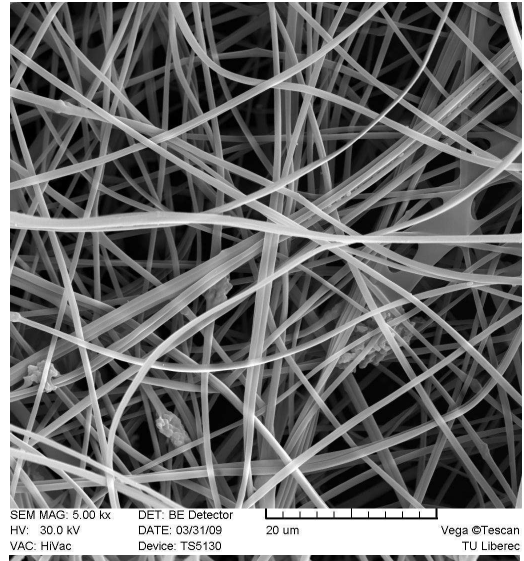
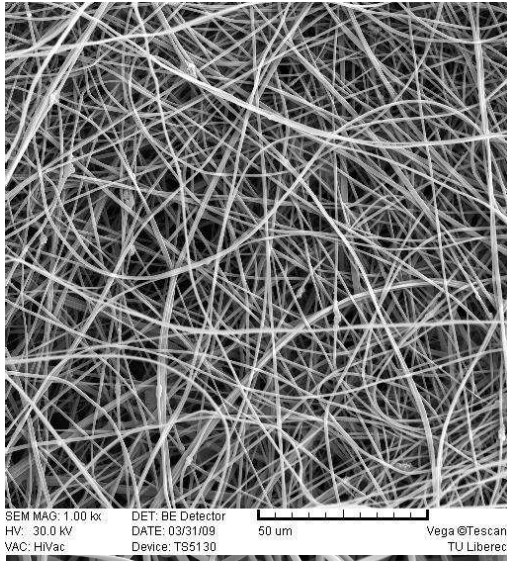
PUR 5



PUR 6



PAN



Príloha B

Zloženie simulovanej pľúcnej tekutiny s pH 4,5.

Zložka	Koncentrácia [mg.l ⁻¹]	Zložka	Koncentrácia [mg.l ⁻¹]
<i>NaCl</i>	7 120	<i>H₂NCH₂CO₂H</i>	118
<i>NaHCO₃</i>	1 950	<i>Na₃C₆H₅O₇ · 2H₂O</i>	152
<i>CaCl₂</i>	22	<i>Na₂C₄H₄O₆ · 2H₂O</i>	180
<i>Na₂HPO₄ · 12H₂O</i>	373	<i>NaC₃H₃O₃</i>	172
<i>Na₂SO₄</i>	79	<i>C₃H₆O₃ (90%)</i>	156
<i>MgCl₂</i>	99	<i>HCl</i>	4,1

Príloha C

Vzorky z oderu nanovláknenných materiálov zo zariadenia Nu-Martindale 864.



PVA pred oderom.



PVA po odere.



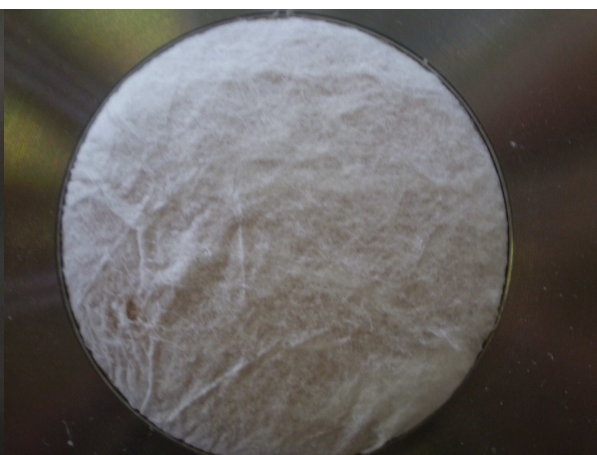
PVA/PAA pred oderom.



PVA/PAA po odere.



PEOEMA pred oderom.



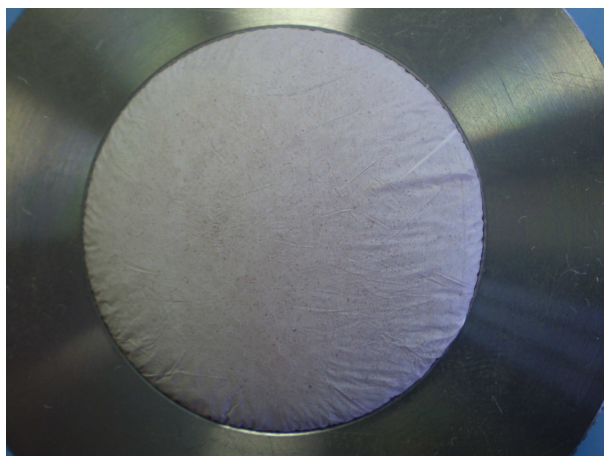
PEOEMA po odere.



HEMA/EOEMA pred oderom.



HEMA/EOEMA po odere.



PUR 5 pred oderom.



PUR 5 po odere.



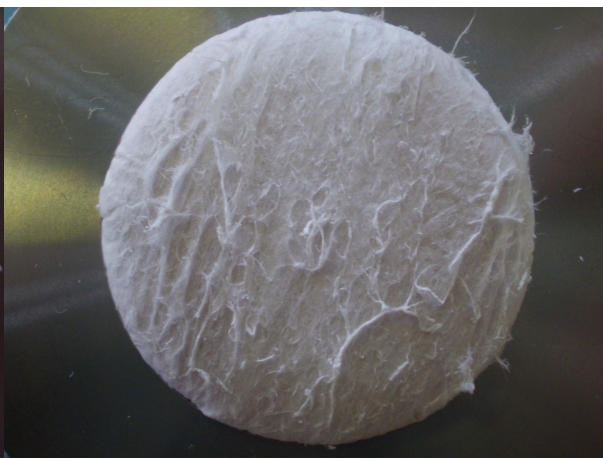
PUR 6 pred oderom.



PUR 6 po odere.



PAN pred oderom.



PAN po odere.